Endophytische Pilze in Fichtennadeln

Peter Mack

1989

Disbui. München
1989

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Endophytische Pilze in Fichtennadeln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Forstwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

Vorgelegt von
Peter Mark
1966

Endophytische Pilze in Fichtennadeln

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Forstwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Peter Mack
1989

Gefördert von der Stiftung Volkswagenwerk

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Schütt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Reinhard Schopf
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. Heinz Butin
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Juli 1989

Wie alles sich zum Ganzen webt,
Eins in dem andern wirkt und lebt!

Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. **Einleitung** 1
1.1 Literaturüberblick 1
1.2 Problemstellung und Ziel der Arbeit 4

2. **Erfassung der Endophytenflora in Fichtennadeln** 6
2.1 Material und Methoden 6
2.1.1 Orte der Probenahme 6
2.1.2 Probenahme 11
2.1.3 Probenverarbeitung 11
2.1.4 Bestimmung der Pilze 12
2.1.5 Mathematische und statistische Verfahren 12
2.2 Ergebnisse 13
2.2.1 Abhängigkeit des Endophytenbefalls von der Jahreszeit 13
2.2.2 Einfluß des Nadelalters auf die Befallsrate 18
2.2.3 Isolierte Pilzarten 22
2.2.4 Artenspektren von Arber und Deisenhofen 25
2.2.5 Zahl der Arten in Abhängigkeit von der Jahreszeit 29
2.2.6 Zahl der Arten in den Nadeljahrgängen 31
2.2.7 Verteilung der häufigsten Arten in Abhängigkeit von Jahreszeit und Nadelalter 34
2.3 Endophytenbesatz in Platten- und Kammfichten 43
2.3.1 Material und Methoden 43
2.3.1.1 Standorte 43
2.3.1.2 Zeitpunkt und Umfang der Probenahme 44
2.3.2 Ergebnisse 45
2.3.2.1 Befallshäufigkeit 45
2.3.2.2 Verteilung der Arten 49

3. **Wirkung von Pollutantien auf endophytische Pilze in vitro** 57
3.1 Material und Methoden 57
3.1.1 Schwefeldioxid und Ozon 57
3.1.1.1 Behandlungsvarianten 58
3.1.1.2 Untersuchungsmaterial 58
3.1.2 Elektrische Felder und Radiowellen 59
3.2 Ergebnisse 60

4. **Untersuchungen zur Variabilität von Lophodermium piceae** 62
4.1 Material und Methoden 62

4.1.1 Herkunft des Pilzmaterials 62
4.1.2 Kulturmerkmale 63
4.1.3 Verwertung von Kohlehydraten 64
4.1.4 Nachweis von Enzymaktivitäten 65
4.1.4.1 Enzymatische Aktivitäten auf festen Nährböden 66
4.1.4.2 Der API ZYM - Test 69
4.1.5 Elektrophorese 71
4.1.5.1 Zusammensetzung der Puffer 72
4.1.5.2 Herstellung des Stärkegels 72
4.1.5.3 Vorbereiten und Auftragen der Proben 74
4.1.5.4 Auftrennung der Isoenzyme 75
4.1.5.5 Anfärbung der Isoenzyme 76
4.2 Ergebnisse 78
4.2.1 Variation der Kulturmerkmale 78
4.2.2 Zuckerabbau 87
4.2.3 Enzymaktivitäten 89
4.2.4 Isoenzymmuster 91

5. Diskussion 93
5.1 Endophytenflora in grünen Fichtennadeln 93
5.2 Variabilität von Lophodermium piceae 106

6. Zusammenfassung der Ergebnisse 109

7. Literaturverzeichnis 112
Anhang 124

1. Einleitung

Pilze können in sehr vielfältiger Weise zusammen mit höheren Pflanzen leben. Ihr Vorhandensein ist von außen aber nur dann sichtbar, wenn sie entweder auf der Wirtspflanze – also *epiphytisch* – leben oder bei *endophytischer* und pathogener Lebensweise durch Schädigung des Wirtsgewebes augenfällig werden. So verwundert es nicht, daß Phytopathologen lange Zeit endophytische Pilze allgemein als Pathogene einstuften, weil die nicht pathogenen Arten meistens übersehen wurden.
Aus dem gleichen Grund wurde der Begriff "Parasitismus" als eine den Wirt schädigende, d.h. pathogene Lebensweise definiert. Das aus dem Griechischen stammende Wort "Parasit" (παράσιτος = Tischgenosse, Mitspeisender) beschreibt jedoch nur die Art der Ernährung. Eine Aussage darüber, ob diese Ernährungsweise für den Wirt nachteilig ist oder ob sich der "Tischgenosse" nur vom Überfluß des Wirtes ernährt, wird nicht gemacht.

Die Art der Beziehung zwischen Wirt und Pilz hängt unter anderem von der Pathogenität des Pilzes ab. GÄUMANN (1951) differenziert zwischen Pilzen, die aufgrund ihrer hohen Virulenz immer eine Erkrankung verursachen, also "obligaten Pathogenen", und "Schwächeparasiten", die nur bei Schwächung des Wirtes pathogen werden, sonst aber in einer mutualistischen Beziehung zum Wirt leben oder von diesem toleriert werden.

Schon 1884 geht deBARY auf die Unterschiedlichkeiten der Wirt-Parasit-Beziehungen ein. Er beschreibt diese Lebensgemeinschaft als eine Symbiose, die – in Abstufungen – von einem den Wirt schädigenden Parasitismus (z.B. Rostpilze) bis zu einem für beide Partner vorteilhaften Mutualismus (z.B.Mycorrhiza, Flechten) auftritt.

1.1 Literaturüberblick

Die Verbreitung endophytischer Pilze in gesundem Wirtsgewebe und ihre ökologische Bedeutung fanden wegen ihrer verborgenen Lebensweise in der mykologischen Forschung erst relativ spät Beachtung. Die Kenntnisse darüber sind daher bis heute noch lückenhaft.

Einer der frühesten Berichte über endophytische Pilze, die in gesundem Wirtsgewebe leben stammt von LEWIS (1924). Er isolierte aus lebenden, symptomlosen Nadeln von *Larix laricina* (Du Roi)Koch einen Pilz, über dessen Artzugehörigkeit er jedoch keine Angaben machte. Ausführlicher beschrieb SAMPSON in den Dreißiger Jahren das Vorkommen von endophytischen Pilzen bei verschiedenen Gräsern. Er fand Endophyten in verschiedenen Teilen der Pflanze (Blätter und Samen). BLOOMBERG (1966) wies Endophyten in unterschiedlichen Teilen der Keimlinge von *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco nach.

Erst die neuere mykologische Literatur greift häufiger das Vorkommen endophytischer Pilze auf. Arbeiten von CARROLL et al. (1977), PETRINI et al. (1979), PETRINI & MÖLLER (1979), LUGINBÜHL & MÖLLER (1980c), PETRINI & CARROLL (1981), RIESEN & SIEBER (1985), BUTIN (1986) WHITE (1987) u.a. belegen, daß Wirtspflanzen aus den unterschiedlichsten Pflanzenfamilien und geographischen Regionen von Endophyten infiziert sind. Pilzfreie Pflanzen konnten bisher noch nicht gefunden werden (PETRINI et al. 1979, PETRINI,O. & MÖLLER 1986). Dies weist auf eine sehr weite Verbreitung der Endophyten hin (CARROLL 1988).

Mittlerweile konnten über 750 verschiedene Endophyten isoliert werden (ANONYM 1984). Die überwiegende Zahl sind Vertreter der Ascomyceten und Deuteromyceten; nur vereinzelt wurden Oomyceten und Basidiomyceten isoliert (PETRINI & MÖLLER 1979, LUGINBÜHL & MÖLLER 1980c, WIDLER & MÖLLER 1984, RIESEN & SIEBER 1985, BUTIN 1986, FISHER et al. 1986, PETRINI,O. & MÖLLER 1986, SCHNELL 1987, SIEBER & HUGENTOBLER 1987, SIEBER 1988, v.TIEDEMANN et al. 1988).

Neben Ubiquisten konnten auch Arten nachgewiesen werden, die auf wenige Wirtspflanzen beschränkt sind (PETRINI et al. 1979, PETRINI & MÖLLER 1979, LUGINBÜHL & MÖLLER 1980c, PETRINI & CARROLL 1981, BUTIN 1986). Die Spezialisierung einzelner Endophyten auf bestimmte Wirtsarten schränkt PETRINI (1985) jedoch auf das Familien-Niveau ein. Eine taxonomische Unterscheidung der Wirtspflanzen aufgrund der Zusammensetzung des Endophytenbesatzes schließt er daher aus.
Gewichtigere Einflußfaktoren sind die standörtlichen Bedingungen, die das Vorkommen einer Endophytenart bestimmen. Die Abhängigkeit der Endophytenflora vom Klima des Standortes und damit auch von der Jahreszeit fanden CARROLL et al. (1977), PETRINI & MÖLLER (1979), LU-

GINBOHL & MOLLER (1980c), PETRINI et al. (1982), WIDLER & MOLLER (1984), RIESEN & SIEBER (1985), PETRINI,O. & MOLLER (1986), BARKLUND (1987), SIEBER et al. (1988), v.TIEDEMANN et al.(1988), TODD (1988). Eine Abnahme der Endophytenzahl mit zunehmender Höhenlage beobachteten WIDLER & MOLLER (1984) und SIEBER (1988).

Neben den geographischen und klimatischen Faktoren wird die Artenzusammensetzung der Endophytenflora auch vom Alter des Wirtsgewebes beeinflußt. Es kann eine Sukzession von Pilzen mit parasitischer zu überwiegend saprophytischer Lebensweise stattfinden (PETRINI & MOLLER 1979, LUGINBOHL & MOLLER 1980c, WIDLER & MOLLER 1984). Demnach sind die wirtsspezifischen Arten in der Lage, gesundes, lebendes Gewebe zu besiedeln, während die eher saprophytisch lebenden Endophyten den weniger spezialisierten Ubiquisten zuzuschreiben sind. BUTIN (1986) beschreibt *Lophodermium piceae* als parasitischen Pilz, der lange Zeit symptomlos in gesundem und jüngerem Nadelgewebe lebt, in der Fruktifikation auf abgefallenen Nadeln sieht er den Wechsel zu einer eher saprophytischen Lebensweise.

Endophyten können unterschiedliche Teile ihrer Wirtspflanzen bewohnen (LUGINBOHL & MOLLER 1980, WIDLER & MOLLER 1984, PETRINI & FISHER 1986, RIESEN & SIEBER 1985, WHITE & MORGAN-JONES 1987, SIEBER et al.1988). Die Ursache für das Vorkommen in der ganzen Wirtspflanze liegt zum einen in Lokalinfektionen an verschiedenen Pflanzenteilen, zum anderen können die Mycelien über das Gefäßsystem in die diversen Pflanzenteile wandern (v.TIEDEMANN et al.1988), weshalb PETRINI et al. (1979) und BERTONI & CABRAL (1988) an den Mittelrippen der untersuchten Blätter einen höheren Pilzbesatz feststellten. Eine weitere Erklärung für das Vorkommen von Endophyten in verschiedenen Teilen der Wirtspflanze ist die Infektion bereits des Embryos oder anderer Teile des Samens bzw. der Frucht (RIESEN & SIEBER 1985, WHITE & COLE 1986, LATCH et al. 1987).

Hinweise auf die Bedeutung der Endophyten während eines jahrelangen symptomlosen Lebens und fehlender Pathogenität sind nicht häufig. LUGINBOHL & MOLLER (1980b) fanden, daß sich Endophyten von der Wirtspflanze nicht nur ernähren sondern auch Stoffe an sie abgeben. Sie infizierten Samen von *Hedera helix* L. mit *Aureobasidium pullulans* und *Epicoccum purpurascens*. Diese Pilze förderten die Geschwindigkeit der

Samenkeimung, nicht aber die Keimrate. PETRINI,O. & MÖLLER (1986) beobachteten eine keimungsfördernde Wirkung von *Hypoxylon* auf Samen von *Nicotiana tabacum*.
Neben Wuchsstoffen (z.B. Gibberellin) können Endophyten auch hemmende Substanzen produzieren. *Cryptosporiopsis* bildet antimikrobielle und -mykotische Stoffe und *Rhabdocline parkeri* tötet mit einem Giftstoff ein gallenbildendes Insekt auf Douglasien-Nadeln (FISHER et al. 1984). Die Produktion von Mutterkorn-Alkaloiden wies BACON (1988) bei *Balansia* in *Cyperus spp.* nach.

1.2 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Mit Beginn dieses Jahrzehnts traten erstmals neuartige Waldschäden an der Fichte (*Picea abies* [L.]Karst.) auf (SCHOTT 1981). Zum Zeitpunkt der Problemstellung dieser Arbeit (1985) waren in Bayern bereits 31% dieses wichtigen Waldbaumes mittelstark (Schadstufe 2) und 3% stark geschädigt oder abgestorben (Schadstufe 3 und 4) (Bayer.St.Min.Ern.Landw. Forst. 1985). Das symptomatologisch auffallendste Schadbild ist die allmähliche Kronenverlichtung durch vorzeitiges Schütten vor allem älterer Nadeljahrgänge. Daran beteiligten Pilzen wurde von REHFUESS & RODENKIRCHEN (1984) eine primäre, von BUTIN & WAGNER (1985), KOWALSKI & LANG (1984) und SCHOTT (1985) dagegen nur eine sekundäre Bedeutung zugeschrieben.

Da endophytische Pilze auch in symptomlosen Fichtennadeln in großer Frequenz vorkommen, die Kenntnisse über die Artenzusammensetzung der Endophytenflora und ihre Bedeutung für den Wirt aber sehr lückenhaft sind, war nicht auszuschließen, daß diese Endophyten das Verhalten des Wirtes gegenüber Umwelteinflüssen verändern, bevor eine durch entsprechende Pilze sichtbare Erkrankung auftritt.

Die vorliegende Literatur stellt die Endophytenflora in der Phyllosphäre höherer Pflanzen als ein komplexes Phänomen dar, das von vielen Faktoren beeinflußt wird. Diese Komplexität ist auch bei der Pilzflora in symptomlosen Fichtennadeln zu erwarten. Die Bewertung der Relevanz dieser Pilze im Zusammenhang mit den Waldschäden macht eine umfangreiche Inventur der Endophytenflora über einen längeren Zeitraum erforderlich.

Im Rahmen dieser Bestandsaufnahme, die als Grundlage für weitere mykologische Untersuchungen über die neuartigen Waldschäden bei Fichte dienen kann, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. In welchem Umfang sind optisch symptomlose Fichtennadeln verschiedener Nadeljahrgänge von Endophyten befallen?
2. Wie setzt sich das Artenspektrum der Endophytenflora dieser Fichtennadeln zusammen? Sind bekannte Pathogene darunter, die eine vitalitätsmindernde Wirkung erwarten lassen?
3. Ist eine Sukzession der Artenzusammensetzung in Abhängigkeit vom Alter der besiedelten Nadeln erkennbar, die Rückschlüsse auf die Lebensweise der Endophyten (Primärbesiedler, Pathogene, Schwächeparasiten, Saprophyten) zulassen?
4. Bestehen individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Probebäumen, und lassen sich an geographisch getrennten Standorten Verschiedenheiten in der Dichte und der Artenzusammensetzung feststellen?
5. Wie stark wird die Endophytenflora von äußeren Faktoren wie Witterung und ausgewählten Pollutantien in ihrer Dichte und Zusammensetzung beeinflußt?
6. Besteht ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Schädigung von Platten- und Kammfichten und dem Endophytenbesatz? Bewirken morphologische Parameter in der Oberkrone von Platten- und Kammfichten eine unterschiedliche "Auskämmwirkung" für Pilzsporen?
7. Der als Schwächeparasit beschriebene Pilz *Lophodermium piceae* (Fuckel)Höhn. zeigte in Isolaten, die während der Inventur gewonnen wurden, eine auffallende Variabilität, ein Phänomen, das auch RACK & BUTIN (1984) beobachteten. Ziel der Untersuchungen ist, mit verschiedenen Methoden diese Variabilität zu klassifizieren, um eine mögliche Rassenbildung erkennen zu können. Außerdem soll geklärt werden, ob bestimmte Merkmale mit dem Auftreten von *L. piceae* in Fichtennadeln korrelieren und damit Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Aggressivität der Isolate zulassen.

2. Erfassung der Endophytenflora in Fichtennadeln

In diesem Kapitel wird untersucht, in welchem Umfang die Nadeln der Fichte von endophytischen Pilzen besiedelt sind. Im Vordergrund stehen die Fragen, wie stark sich Jahreszeit und Nadelalter auf den Endophytenbesatz auswirken, aus welchen Arten sich die Endophytenflora zusammensetzt, und ob die Verzweigungsform der Fichte die Intensität des Pilzbefalls beeinflußt. Die Probenahme an zwei geographisch getrennten Standorten soll klären, ob regionale Unterschiede im Einfluß äußerer Faktoren und der Artenzusammensetzung bestehen.

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Orte der Probenahme

Um standortbedingte Unterschiede in der Endophytenflora vergleichen zu können, wurden an zwei verschiedenen Standorten die für mykologische Untersuchungen benötigten Fichtennadeln gesammelt. Einer der Standorte liegt im Bayerischen Wald am Großen Arber (FoA Bodenmais), der andere südlich von München im Deisenhofener Forst (FoA Sauerlach). Die Standorte werden im Text "Arber" bzw. "Deisenhofen" genannt. Die Lage der Probeorte sowie die Bestands- und Klimadaten sind in Abb.1-3 und in Tab.1 zusammengefaßt.
Die Bestandsdaten wurden von REHFUESS (1986) und forstamtseigenen Unterlagen übernommen. Die Klimadaten stellte das Wetteramt München zur Verfügung.

	Deisenhofen	Arber
Forstamt Forstort	Sauerlach Distr. Hirschbrunnen Abt. Hirschbrunnen,Ger.	Bodenmais Distr. Hochwald Abt. Gschwendet
Standort Lage ü.NN Neigung	 565m eben	 1150m schwach nach SW
Boden Ausgangsgestein Bodenart Bodentyp	 Fluvioglazialer Kalkschotter mäßig trockner Lehm schwach podsolige Parabraunerde	 Periglazialer Paragneis-Schutt frischer Lehm podsolige Braunerde
Bestand Zusammensetzung Alter Eingriffe	 90%Fichte 3%Kiefer 7%Buche 20 - 45 Jahre normal durchforstet	 Fichtenmonokultur 20 - 25 Jahre —

Tab.1: Bestandsdaten der Probeorte Arber und Deisenhofen.

Abb. 1: Geographische Lage der Probeorte und Klimastationen ▲=Probeort, O=Klimastation, A=Arber, At=Attenkam, B=Bodenmais, D=Deisenhofen, F=Großer Falkenstein, G=Großhöhenrain, H=Holzkirchen, S=Sauerlach, M=München, N=Nürnberg.

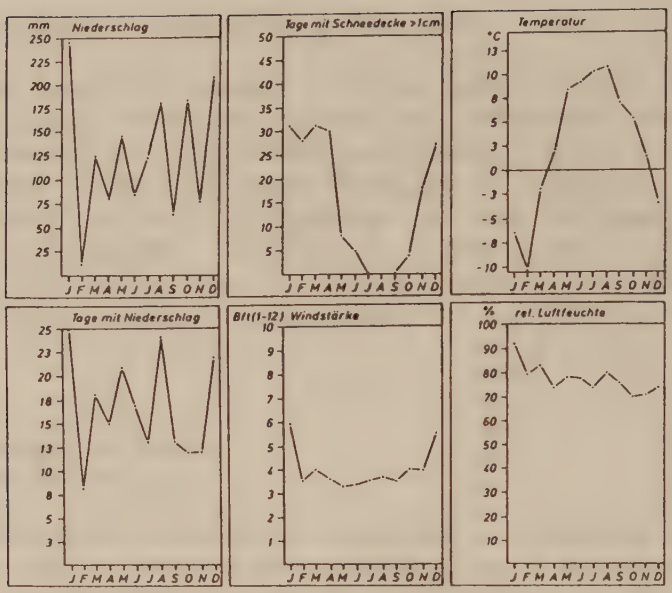


Abb.2: Klimadiagramme der Station "Großer Arber" für das Jahr 1986.

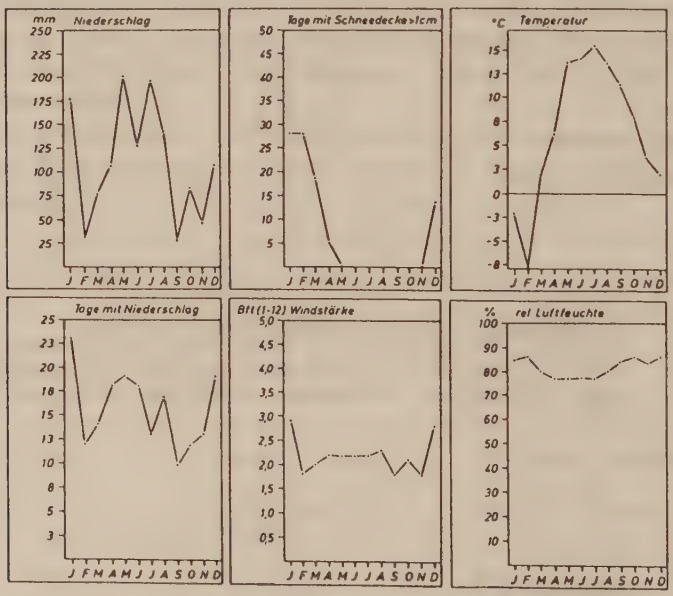


Abb.3: Klimadiagramme der Station "Holzkirchen" für das Jahr 1986.

Zur Charakterisierung der ökologischen Bedingungen wurden für die Standorte "Arber" und "Deisenhofen" auf der Berechnungsgrundlage von KNOCH (1952) der Mittlere Trockenheitsindex (MTI) berechnet. Verwendet wurden dafür die Daten der Klimastationen "Großer Falkenstein" (1976 - 1982) und "Großer Arber" (1983 - 1986) bzw. "Großhöhenrain" (1976 - 1981), "Attenkam" (1982) und "Holzkirchen" (1983 - 1986).
Der einheitslose Wert des MTI ermöglicht es wegen der Kombination mehrerer Klimadaten die Bedeutung der Witterung für das Gedeihen der Pflanzen zu beurteilen. Auf einen Standort bezogen bedeutet das Ansteigen des MTI während der Vegetationsperiode oder im Vergleich mehrerer Jahre eine Verbesserung der Wachstumsbedingungen.
Langfristige Beobachtungen (KNOCH 1952) ergaben für den Standort Arber einen Wert von MTI≈130, für Deisenhofen MTI≈80 (Berechnungszeitraum bezogen auf die Vegetationsperiode, Mai - Juli).

Basierend auf Erfahrungs- und Mittelwerten des ehemaligen deutschen Reichsgebietes gehen in den MTI die mittlere Temperatur (t) in °C, die Niederschlagssumme (n) in mm und die Summe der Tage mit Niederschlag über 1 mm (k) - bezogen auf den Berechnungszeitraum - ein:

$$MTI = \frac{z \cdot n}{t + 10} \cdot \frac{k}{R}$$

Die Dauer des Berechnungszeitraumes (z) ist der Quotient aus der Zahl der Monate im Jahr und der Anzahl der Monate, in denen die vorgenannten Witterungsdaten erhoben wurden. "R" ist der Faktor aus der Zahl der Monate, in denen Witterungsdaten erhoben wurden und dem Erfahrungswert 10 (Tage pro Monat mit Niederschlag über 1 mm im deutschen Reichsgebiet).

Der Berechnungszeitraum für den MTI der Jahre 1976 - 1986 (Abb.4) wurde pro Jahr auf drei Monate (Mai bis Juli), für den MTI des Jahres 1986 (Abb.5) auf einen Monat festgelegt.

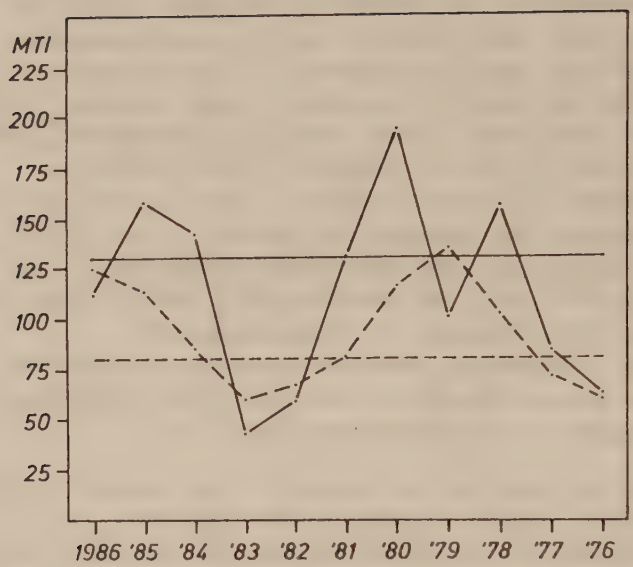


Abb.4: Mittlerer Trockenheitsindex (MTI) der Standorte Arber (———) und Deisenhofen (----), berechnet für die Jahre 1976 - 1986.

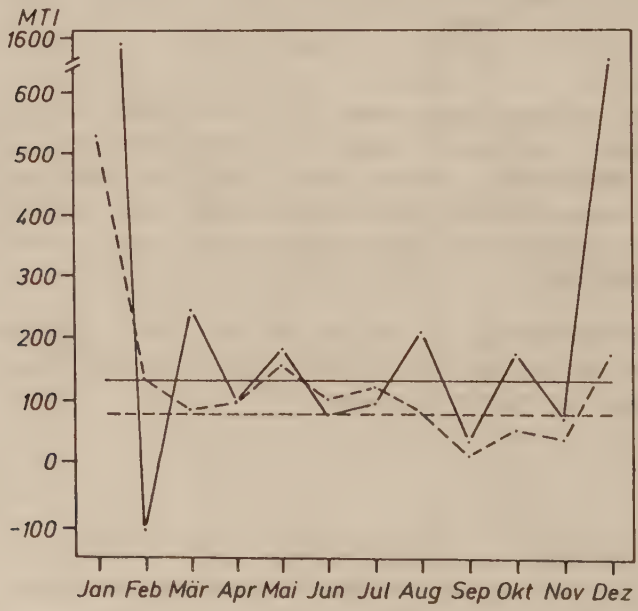


Abb.5: Mittlerer Trockenheitsindex (MTI) der Standorte Arber (———) und Deisenhofen (----), berechnet für das Jahr 1986.
Die horizontalen Linien geben den MTI nach KNOCH (1952) an.

2.1.2 Probenahme

Während des Jahres 1986 wurden am Arber von drei und in Deisenhofen von zwei Fichten in monatlichen Abständen Nadelproben genommen (Tab.2). Pro Baum und Probe wurden vier Zweige (jeweils N,S,O,W exponiert) mit möglichst vielen vollständigen Nadeljahrgängen aus dem unteren Kronenbereich (ca.1,5-2m Höhe) entnommen. Von diesen Zweigen wurden pro Nadeljahrgang 20 zufällig ausgewählte Nadeln auf Endophytenbesatz untersucht.
Alle Proben stammen von den gleichen, im Frühjahr ausgesuchten Bäumen, um mögliche individuelle Verschiedenheiten der Wirtspflanzen erkennen zu können. Untersucht wurden gesundaussehende, grüne Nadeln.

Standort	Baumnr.	Feb	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez
Arber	1	2-6	2-7		1-9	1-8	1-8	1-8	1-6	1-6	1-7
	2	2-8	2-10		1-8	1-7	1-9	1-8	1-6	1-6	1-7
	3	2-6	2-8		1-9	1-10	1-6	-*	-	-	-
Deisenhofen	4			1-9	1-9	1-9	1-9	1-8	1-6	1-6	
	5			1-9	1-9	1-9	1-9	1-6	1-6	1-6	

Tab.2: Zeitpunkt und Umfang der Probenahme. Angegeben sind die untersuchten Nadeljahrgänge; Jahrgang 1 = 1986.
*) Baum 3 wurde Ende August gefällt.

2.1.3 Probenverarbeitung

Die Oberfläche der Nadeln wurde 1 min in Natriumhypochlorid (ca. 4% aktives Chlor) sterilisiert und ca. 1 min mit sterilem Wasser nachgewaschen. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen Nadelspitze und -basis abgeschnitten und die ca. 6mm langen Mittelstücke jahrgangsweise getrennt in Petrischalen mit 2%igem Malzagar gelegt.
Die Bebrütung der Nadeln erfolgte bei Raumtemperatur und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus.
Nach zwei bis vier Wochen begann bei den infizierten Nadeln das Myzel der endophytischen Pilze aus den Schnittstellen heraus in den Nährboden zu wachsen. Nach sechs Wochen wurde der Anteil der infizierten Nadeln bestimmt.

Da je Petrischale 10 Nadeln kultiviert wurden, mußten, um Reinkulturen zu erhalten, die Pilze auf neue Schalen abgeimpft werden, bevor die Mycelien ineinanderwuchsen. Von diesen Subkulturen wurden Stammkulturen in Schrägagarröhrchen (2% Malz) angelegt und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4 Bestimmung der Pilze

Die Artbestimmung aus Pilzkulturen ist in vielen Fällen schwierig oder unmöglich, da entweder eine Aufschlüsselung nach Kulturmerkmalen fehlt oder die Kulturen steril bleiben.
Fruchtkörper und Sporenbildung sind in den meisten Fällen unerläßliche Merkmale für die Bestimmung von Pilzkulturen. Es mußten deshalb möglichst frische Kulturen mikroskopisch untersucht werden, da bei alten oder oft überimpften Kulturen ein Alterungsprozeß stattfindet bzw. eine Fruktifikation ausbleibt (PETRINI & MÜLLER 1979, BUTIN pers. Mitt.).
Sterile Kulturen wurden unter langwelligem UV-Licht angezogen, um die Sporulation anzuregen (LEACH 1967 und 1971).
Die Bestimmung bis zur Gattung erfolgte mit Schlüsseln von v.ARX (1970) und CARMICHAEL et al. (1980). Für die Artbestimmung wurden Schlüssel von SUTTON (1980), ELLIS&ELLIS (1985), AINSWORTH et al. (1973) und Monographien herangezogen. Vier Isolate konnten vom "Centraalbureau voor Schimmelcultures" in Baarn (Holland) identifiziert werden. Sie sind in Tab.4 und 11 mit "CBS" gekennzeichnet.

Für die mikroskopische Untersuchung der Isolate wurden Quetschpräparate in Wasser hergestellt, für Anfärbungen diente Lactophenolblau oder Melzers Reagens.

2.1.5 Mathematische und statistische Verfahren

Die mathematische und statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programmpaket SPSS/PC+ (NORUSIS 1986) durchgeführt.
Bei dem Vergleich zweier bzw. mehrerer unabhängiger Stichproben fanden der U-Test nach WILCOXON (1945), MANN&WHITNEY (1947) (Wilcoxon Matched-pairs Signed-ranks Test) bzw. der H-Test nach KRUSKAL & WALLIS (1952) (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA) Verwendung.

Für die Verwerfung der Nullhypothese wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) auf dem 5%-Signifikanzniveau festgelegt. Signifikante Befunde ($P \leq 0{,}05$) sind mit der dreistufigen Sternsymbolik gekennzeichnet:

[*] $0{,}05 \geq P > 0{,}01$ [**] $0{,}01 \geq P > 0{,}001$ [***] $P \leq 0{,}001$

Für den Vergleich des Artenspektrums von zwei oder mehreren Bäumen bzw. Standorten fand die Formel zur Berechnung des Similarity coefficient "S_{AB}" nach KANDLER (1981) Verwendung:

$$S_{AB} = \frac{2\ N_{AB}}{N_A + N_B}$$

Für zwei Standorte bzw. Bäume "A" und "B" ist N_{AB} die Anzahl der gemeinsamen Pilzarten, N_A die Artenzahl von "A" und N_B die von "B". Der S_{AB}-Wert liegt im Bereich $0 \leq S_{AB} \leq 1$. Im Falle $S_{AB}=1$ sind die Artenspektren von "A" und "B" zu 100% identisch; wenn $S_{AB}=0$, existieren keine gemeinsamen Arten. Über die Häufigkeit der einzelnen Arten wird jedoch keine Aussage gemacht.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Abhängigkeit des Endophytenbefalls von der Jahreszeit

Von 5540 untersuchten Nadeln waren 1129 von endophytischen Pilzen besiedelt (Tab.3). Dies entspricht einer Infektionsrate von 20,4%. Am **Arber** liegt der Anteil der von Endophyten besetzten Nadeln im Jahresmittel mit 23,4% deutlich höher als am Standort **Deisenhofen** (15,4%). Die individuellen Unterschiede der Infektionsrate reichen am **Arber** von 15,9% (Baum 3) bis 31,4% (Baum 1). Baum 2 liegt mit 20,1% dazwischen. In **Deisenhofen** liegen die Jahresmittelwerte der Infektionsrate dichter beinander (Baum 4 13,8%; Baum 5 17,1%).

	insg.	A	D	1	2	3	4	5
untersuchte Nadeln	5540	3340	2200	1260	1340	740	1120	1080
infizierte Nadeln	1129	783	339	396	269	118	154	185
%-Infektion	20,4	23,4	15,4	31,4	20,1	15,9	13,8	17,1

Tab.3: Anzahl und Prozentsatz der von Endophyten besiedelten Nadeln. A = Arber, D = Deisenhofen, 1-5 = Baumnummer.

Bei der Betrachtung der Endophytenanzahl am Standort **Arber** (Abb.6) wurden nur Baum 1 und 2 berücksichtigt, da die Entnahme von Baum 3 (Tab.2) die Gesamtzahl der Endophytenisolierungen ab September verringert. Die Kurve zeigt drei Maxima im Juni, September und November. Die Zahl der von Endophyten besiedelten Nadeln ist bis Juni steigend, fällt im Oktober zu einem Jahresminimum ab und liegt am Jahresende wieder im Bereich des Jahresmittelwertes ($\bar{x}$). Die Befallskurve des Standortes spiegelt die individuellen Schwankungen der Einzelbäume wieder, da alle drei Bäume einen ähnlichen Kurvenverlauf aufweisen.

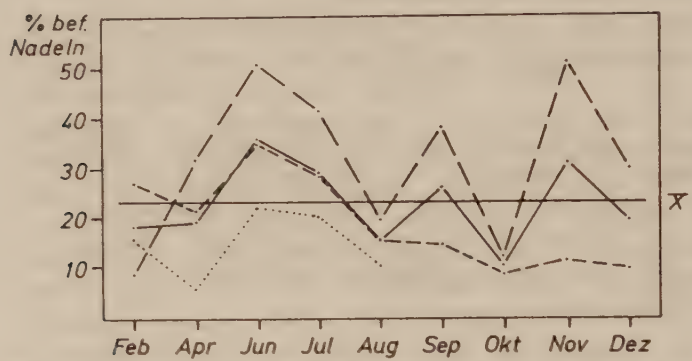


Abb.6: Monatliche Anzahl der befallenen Nadeln (in %) am Arber. (% bezogen auf die Zahl der untersuchten Nadeln).
$\bar{x}$ = Jahresmittelwert

—·— Baum 1 - - - - Baum 2 ····· Baum 3 ——— Mittelwert

Im Gegensatz zum Arber ist in **Deisenhofen** die Gesamtzahl der Endophytenisolate (Abb.7) auf die Überlagerung der Einzelbaumkurven zurückzuführen. Während bei **Baum 4** die meisten Endophyten im Herbst (September und Oktober) isoliert werden konnten, weist **Baum 5** die größte Endophytenzahl im Sommer (Juni bis August) auf.

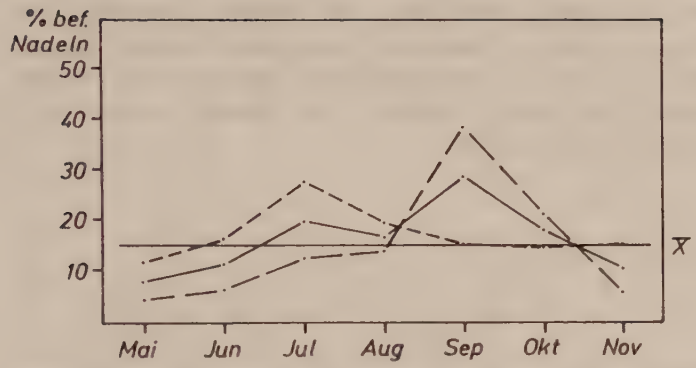


Abb.7: Monatliche Anzahl der befallenen Nadeln (in %) in Deisenhofen (% bezogen auf die Zahl der untersuchten Nadeln).
x̄ = Jahresmittelwert

—— Baum 4 - - - - Baum 5 ——— Mittelwert

Am **Arber** ist ein Zusammenhang zwischen Endophytenanzahl und der Witterung erkennbar (Abb.8): Mit der zeitlichen Verzögerung von einem Monat wiederholt sich in der Kurve des Endophytenbesatzes der Verlauf des mittleren Trockenheitsindexes MTI.

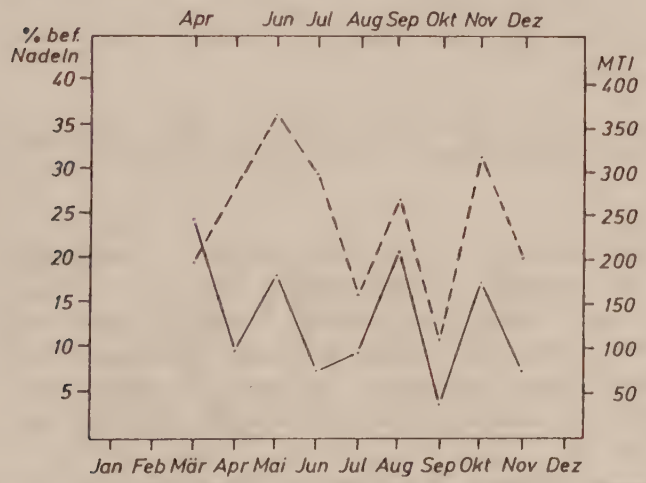


Abb.8: Gegenüberstellung des MTI mit der Zahl der befallenen Nadeln (in %) für das Jahr 1986 am Arber. Die Zahl der befallenen Nadeln ist um einen Monat nach linksverschoben eingetragen (obere Monatsskala).

—— % bef. Nadeln ——— MTI

Der Einfluß der Jahreszeit auf die Anzahl der von Endophyten besiedelten Nadeln wurde auch in Abhängigkeit vom Nadelalter untersucht. Betrachtet man am Arber die einzelnen Nadeljahrgänge separat, so ist festzustellen, daß sich die Besiedelungsmaxima von Juni/ Juli, und in eingeschränktem Maße auch im September und November in allen Jahrgängen beobachten lassen (Abb.9).

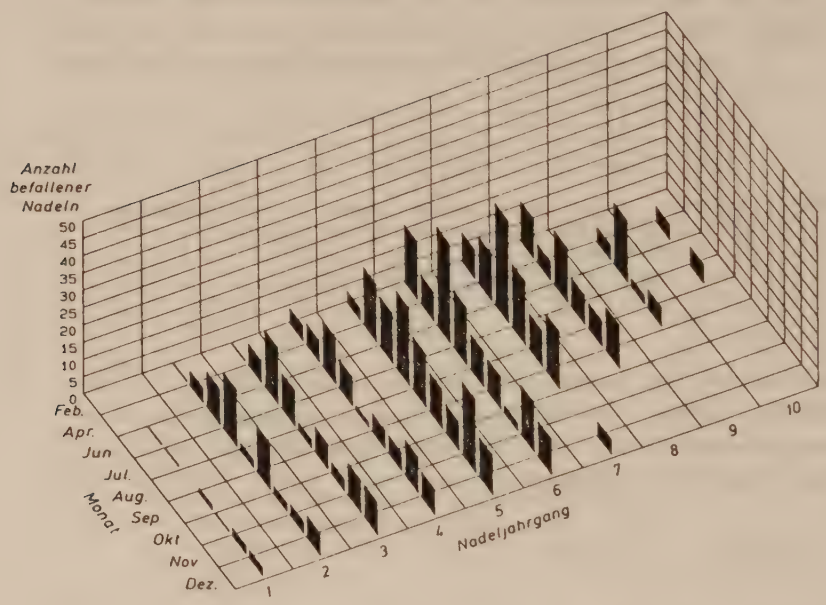


Abb.9: Monatliche Anzahl der befallenen Nadeln am Arber; jeder Nadeljahrgang einzeln dargestellt (Mittel aus Baum 1 und 2).

Anders sind die Verhältnisse bei den beiden Individuen in Deisenhofen. Der Verlauf des monatlichen Endophytenbefalls setzt sich, wie schon oben erwähnt, aus den beiden unterschiedlichen Kurven von Baum 4 und 5 zusammen (Abb.7). Wegen der größeren individuellen Unterschiede muß, um eine Datenüberlagerung zu vermeiden, die Dichte des Endophytenbesatzes innerhalb der Jahrgänge für jeden Baum getrennt dargestellt werden (Abb.10 und 11).

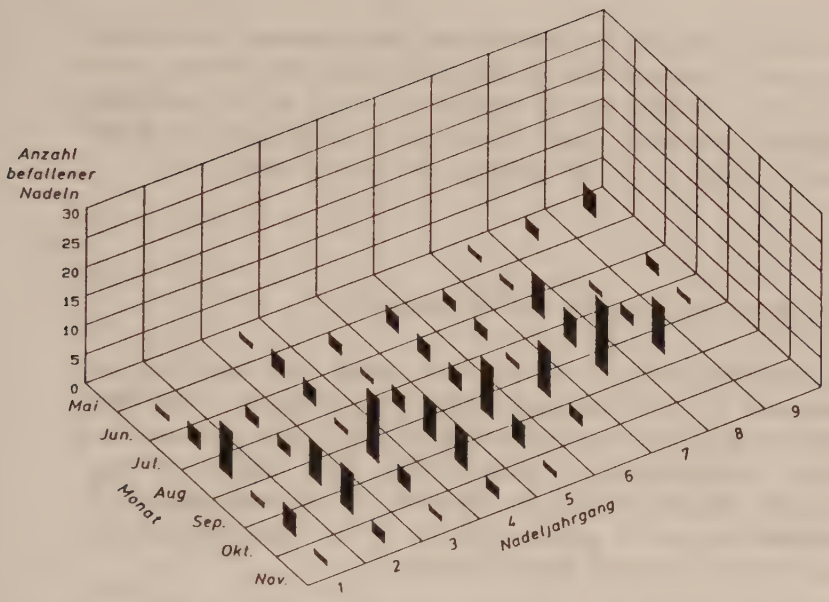


Abb.10: Monatliche Anzahl der befallenen Nadeln in Baum 4 (Deisenhofen); jeder Nadeljahrgang einzeln dargestellt.

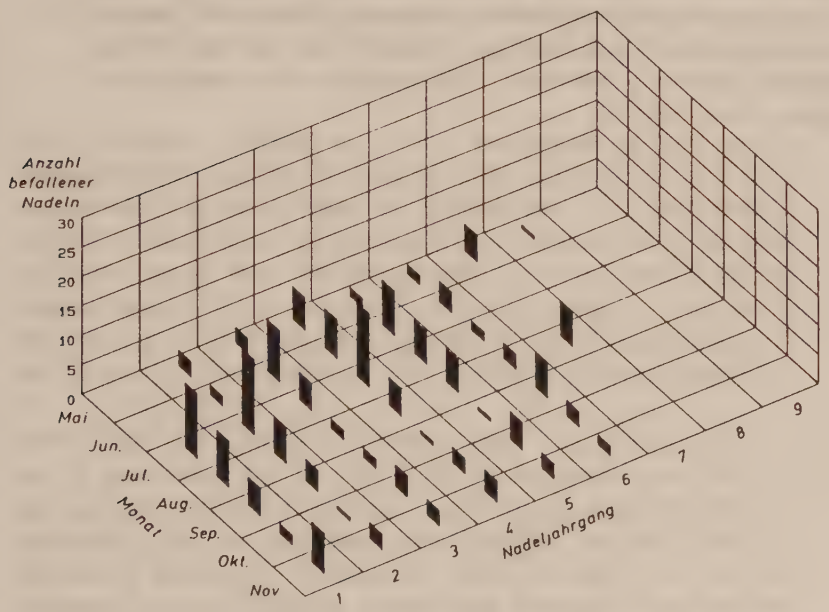


Abb.11: Monatliche Anzahl der befallenen Nadeln in Baum 5 (Deisenhofen); jeder Nadeljahrgang einzeln dargestellt.

Bei Baum 4 zieht sich das Befallsmaximum vom September mit Ausnahme des 1. und 9. Jahrganges durch alle Altersstufen. Baum 5 weist nur im 1., 2. und 4. Jahrgang das Juli-Maximum von Abb.7 auf. In den übrigen Jahrgängen sind keine Trends erkennbar. Dies schlägt sich auch in dem relativ "ruhigen" Verlauf der Infektionskurve (Abb.7) nieder.

2.2.2 Einfluß des Nadelalters auf die Befallsrate

An beiden Standorten war es nicht immer möglich, auch die älteren Nadeljahrgänge (7-10) zu untersuchen (Tab.2), da abgefallene Nadeln weder einem Jahrgang zugeordnet werden können, noch eine Differenzierung zwischen endophytischen und saprophytischen Pilzen zulassen. Um dennoch eine Gegenüberstellung des Pilzbefalls aller Nadelaltersklassen zu ermöglichen, wurde die absolute Zahl der an den Probeästen befindlichen, lebenden, befallenen Nadeln verglichen.

Abb.12 zeigt für den Arber zwei sprunghafte Zunahmen in der Befallsrate. Von Jahrgang 1 (=1986) auf 2 und von 4 auf 5 nimmt die Zahl befallener Nadeln um jeweils 25 zu (Mittel aus drei Bäumen). Der Sprung von Jahrgang 4 auf 5 bedeutet eine Verdoppelung der Anzahl befallener Nadeln. Die höchste Anzahl befallener Nadeln ist bei den fünf- bis siebenjährigen Nadeln zu verzeichnen. Zum Jahrgang 10 hin nimmt die Befallsrate wieder rasch ab.

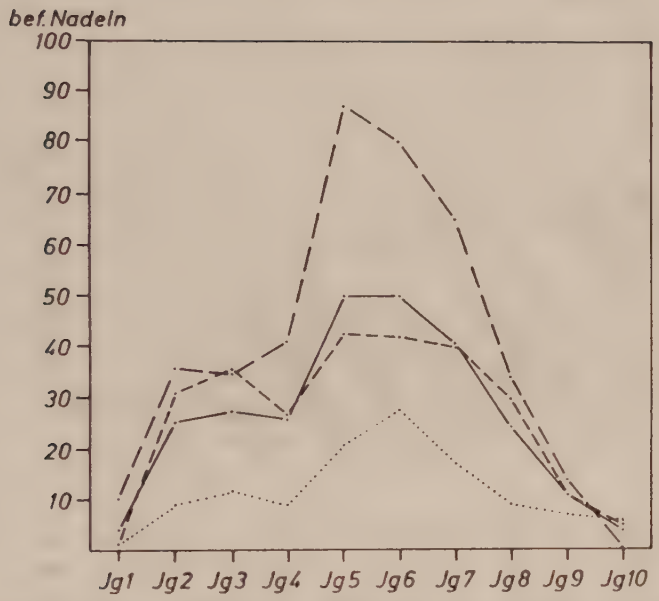


Abb.12: Anzahl der befallenen Nadeln pro Nadeljahrgang am Arber.
—— Baum 1 - - - - Baum 2 ····· Baum 3 ——— Mittelwert

Trotz individueller Unterschiede in der Endophytendichte spiegelt die Mittelwertskurve grob den Kurvenverlauf der Einzelbäume wieder. Deutlich erkennbar ist ein Rückgang der Endophytenzahl im 4. Nadeljahrgang (=1983) bei Baum 2 und 3, bei Baum 1 im 3. Jahrgang. Allen drei Bäumen gemeinsam ist aber nach dem Rückgang der starke Anstieg des Endophytenbesatzes im 5. Jahrgang zu einem Maximalwert im 5. bzw. 6. Nadeljahrgang. Diese Erscheinung zeigt sich auch deutlich im Verlauf des MTI (Abb.4) mit einem Minimalwert im Jahr 1983 (= 4. Nadeljahrgang).

Weniger markant ist der jahrgangsweise Verlauf der Endophytenverteilung in Deisenhofen (Abb.13). Die beiden Bäume weisen, wie schon bei der monatlichen Endophytenhäufigkeit, auch bei der Befallshäufigkeit in Abhängigkeit vom Nadelalter keine Gemeinsamkeiten auf. Der 1. Jahrgang ist mit 26 Nadeln im Standortsmittel höher als am Arber befallen, gleichstark sind die Jahrgänge 2 und 3 von Endophyten besiedelt. Mit einem leichten Anstieg auf 30 Nadeln im Mittel wird bei den vierjährigen Nadeln das Befallsmaximum erreicht. Mit weiter zunehmenden Alter

nimmt dann der Befall ab und erreicht im 9. (ältesten) Jahrgang einen Tiefstpunkt bei 4 Nadeln.

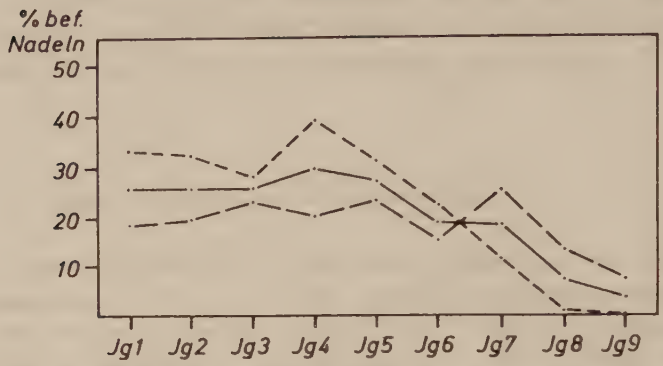


Abb.13: Anzahl der befallenen Nadeln pro Nadeljahrgang in Deisenhofen.
—— Baum 4 ------ Baum 5 ——— Mittelwert

Eine Übereinstimmung mit dem MTI (Abb.4) ist weder bei den Kurven der Einzelbäume noch beim Mittel aus beiden Individuen erkennbar. Der leichte Rückgang der Infektion im 4. Jahrgang des Baumes 4 ist zu gering, um mit dem MTI verglichen werden zu können, Baum 5 zeigt im 4. Jahrgang sogar das Infektionsmaximum.

Die bisher beschriebene Verteilung des Endophytenbesatzes in den Nadeljahrgängen beruhte auf Mittelwerten von allen Probenahmeterminen, d.h. es handelt sich um Jahresmittelwerte. Um ein detaillierters Bild des Besiedelungsmusters in Abhängigkeit vom Nadelalter zu erhalten, wurden die Nadeljahrgänge jeder Probenahme (also monatlich) betrachtet.

Am Arber ist eine Zunahme des Endophytenbefalls mit einem Maximum in Juni/ Juli sowohl in der Zahl der befallenen Jahrgänge als auch in der Zahl der befallenen Nadeln zu beobachten (Abb.14). Bis September liegt das Befallsmaximum bei den fünf- bis siebenjährigen Nadeln und verlagert sich dann auf die vier- bis sechsjährigen Nadeln.
Gleichzeitig mit der Verlagerung der am meisten befallenen Nadeljahrgänge zu den jüngeren Jahrgängen hin ist ab August bis zum Jahresende ein Rückgang des Endophytenbefalls in den älteren Jahrgängen erkennbar.

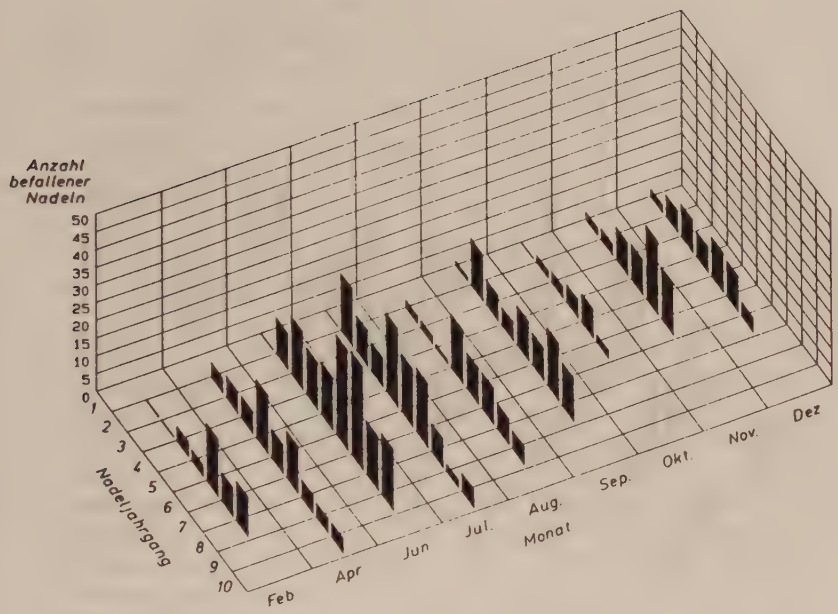


Abb.14: Anzahl der befallenen Nadeln pro Nadeljahrgang am Arber (Mittel aus Baum 1 und 2); jeder Monat einzeln dargestellt. Die Daten sind mit Abb.9 identisch, wegen der besseren optischen Darstellung wurden die Jahrgangs- und Monatsachsen vertauscht.

In **Deisenhofen** ist die monatliche Verteilung der Endophyten in den Nadelaltersklassen heterogener als am Arber (Abb.15). Der starke Befall der ein- und zweijährigen Nadeln in Juli und August ist, betrachtet man den Verlauf der Endophytenhäufigkeit während der Vegetationsperiode (Abb. 7), dem Befallsmaximum von Baum 5 zuzuschreiben; die starke Häufung von Endophyten in den Nadeln mittleren Alters im September und Oktober hingegen deckt sich mit dem Befallsmaximum von Baum 4.

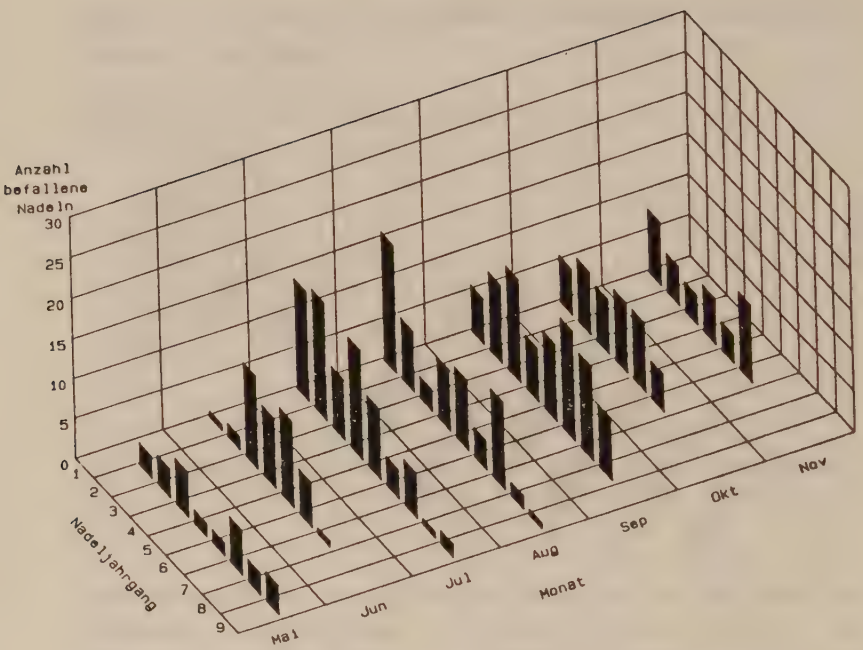


Abb.15: Anzahl der befallenen Nadeln pro Monat und Nadeljahrgang in Baum 4 und 5 (Deisenhofen).

Wie am Arber ist in den älteren Nadeljahrgängen im Herbst ein Rückgang der von Endophyten befallenen Nadeln zu beobachten. So weisen alle Bäume im Oktober und November nur noch sechs benadelte bzw. befallene Jahrgänge auf (Arber: im Dezember noch 7 Jahrgänge).

2.2.3 Isolierte Pilzarten

Die überwiegende Zahl der isolierten Pilze sind Vertreter der Ascomyceten, von denen in Kultur 10 als Teleomorph vorlagen, die übrigen verteilen sich als Anamorph gleichmäßig auf die Hyphomyceten (28 Isolate) und die Coelomyceten (24 Isolate) (Tab.4). Ein steriles Isolat konnte wegen der Ausbildung von Schnallen den Basidiomyceten zugeordnet werden.

	insg.	A	D	1	2	3	4	5
isolierte Arten	63	39	44	25	29	17	27	32
Basidiomycetes	1	1		1				
Ascomycetes	10	5	6	4	3		5	4
Hyphomycetes	28	14	23	9	12	6	14	19
Coelomycetes	24	19	15	11	14	11	8	9

Tab.4: Anzahl der isolierten Arten.

Pilzspezies	A	D	1	2	3	4	5
ASCOMYCETES							
Ceratocystis piceae		5				3	2
Lachnellula sp.	1		1				
Mollisia sp	1			1			
Cyclaneusma minus (A)	2	3	1	1		3	
Pezicula livida		1				1	
Podospora setosa	1		1				
Sclerotinia sp.		6				4	2
Sordaria fimicola	3		1	2			
Xylaria hypoxylon		15				8	7
Xylaria sp.		2					2
DEUTEROMYCETES							
HYPHOMYCETES							
Acremonium sp.	3		3				
Alternaria alternata	2	9	1	1		4	5
Aureobasidium pullulans	6	2	3	3			2
Candida friedrichii (CBS)		17				1	16
Cladosporium cladosporioides	12	4	2	6	4		4
Cylindrocarpon sp.	1			1			
Drechslera spicifera		1					1
Epicoccum purpurascens	3	3	2	1		2	1
Fusarium avenaceum	2			2			
Geniculosporium serpens		21				14	7
Geniculosporium sp.		34				2	32
Gonatobotrys simplex		1					1
Harpographium sp.	10		4	3	3		
Hormonema sp.		5				4	1
Idriella sp.		1					1

Tab.5: Liste der Pilzarten mit Angabe der Anzahl isolierter Stämme an beiden Probeorten und Bäumen.
A = Arber, D = Deisenhofen, 1–5 = Baumnummer.
(A) = Anamorph, (T) = Teleomorph.

Pilzspezies	A	D	1	2	3	4	5
Linodochium sp.		1					1
Nodulisporium sp.1 (CBS)	15	8	11	3	1	7	1
(T:*Hypoxylon cf.fragiforme*)							
Nodulisporium sp.2 (CBS)		90				61	29
Ovularia sp.	7		4		3		
Rhinocladiella sp. (CBS)	39	1	10	21	8		1
Thysanophora penicilloides	3	5		1	2	1	4
Trichoderma viride	1	1		1		1	
Trichothecium roseum		1				1	
Trimmatostroma cf. scutellare		2					2
Tubercularia vulgaris		3				1	2
Ulocladium botrytis	1	2		1			2
Verticicladium trifidum		2				2	
Virgariella sp.		1				1	
COELOMYCETES							
Brunchorstia pinea	2			2			
Ceuthospora sp.	1		1				
Coniothyrium fuckelii	67		31	25	11		
Cryptosporiopsis abietina	8		1	6	1		
Dothistroma pini	1	1			1	1	
Hendersonia acicola	2				2		
Leptostroma		12					12
(T:*Lophodermium macrosporum*)							
Leptostroma	146	14	74	60	12	5	9
(T:*Lophodermium piceae*							
Libertella sp.		2				2	
Myriellina cydoniae		1				1	
Phoma sp.		3				3	
Phomopsis conorum	6	2	3	1	2		2
Phomopsis occulta	5			5			
Phomopsis sp.		3				3	
Pracmopycnis sp.	1	1		1			1
Pyrenochaeta sp.	1	1		1			1
Rhizosphaera kalkhoffii	30		14	5	11		
Sclerophoma pithyophila	32	4	15	13	4	2	2
Sirococcus myrtilli	122	4	29	67	26		4
Sirococcus strobilinus	9	1	2	7			1
Sirococcus sp.	1				1		
Sirodothis sp.	4	1		4			1
Tiarosporella parca	200		170	14	16		
Tubakia sp.	4	1	4			1	
unbestimmte Isolate	28	41	11	14	3	19	22

Tab.5: Fortsetzung

2.2.4 Artenspektren von Arber und Deisenhofen

Trotz der an beiden Standorten etwa gleich großen Anzahl isolierter Arten bestehen starke Unterschiede in der Artenzusammensetzung. So haben am **Arber** *Tiarosporella parca* (200 Isolate), *Lophodermium piceae* (146 Isolate) und *Sirococcus myrtilli* (122 Isolate) mit Abstand den größten Anteil am Gesamtbefall, während in **Deisenhofen** die zu den *Xylariaceae* gehörenden Arten mit 170 Isolaten (*Xylaria sp.* 17, *Geniculosporium spp.* 55, *Nodulisporium spp.* 98 Isolate) deutlich dominieren und *Lophodermium piceae* als typischer Fichtenendophyt (RACK & BUTIN 1984, BUTIN 1986, BARKLUND 1987) mit 14 Isolaten nur eine untergeordnete Rolle spielt. *Tiarosporella parca* konnte in **Deisenhofen** nie und *Sirococcus myrtilli* nur viermal isoliert werden (Abb.16).
Von den sporadisch auftretenden Arten, die in **Deisenhofen** einen relativ größeren Anteil am Artenspektrum haben, heben sich am **Arber** noch *Coniothyrium fuckelii*, *Rhinocladiella sp.*, *Sclerophoma pithyophila*, und *Rhizosphaera kalkhoffii* ab.

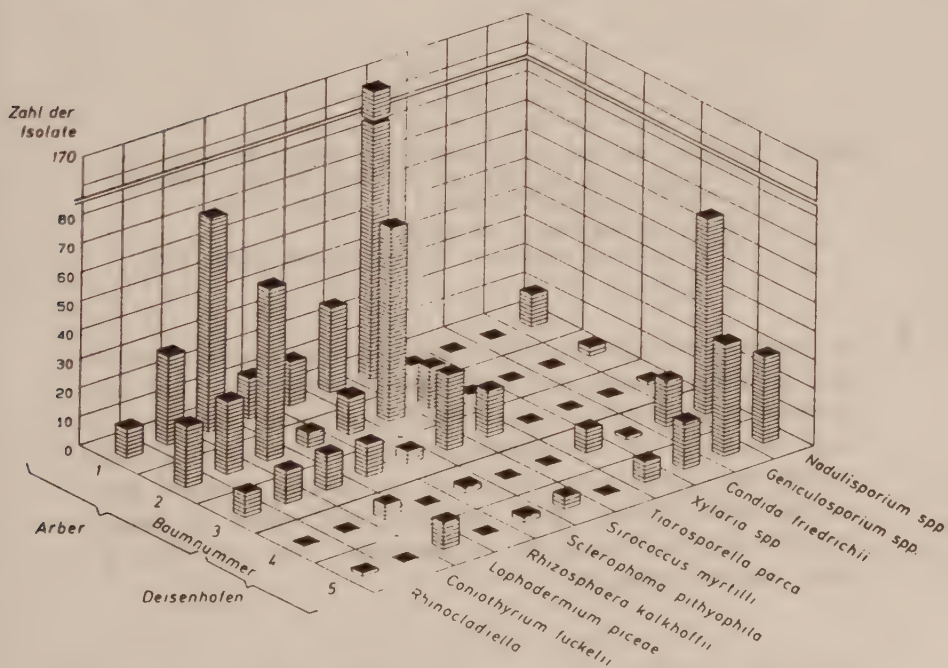


Abb.16: Verteilung der häufigsten Arten auf Bäume beider Standorte.

Um die Artenspektren von Bäumen desselben Standortes und verschiedener Standorte vergleichen zu können, wurden paarweise für alle Bäume S_{AB}-Werte* berechnet. Das Ergebnis ist in Abb.17 veranschaulicht:

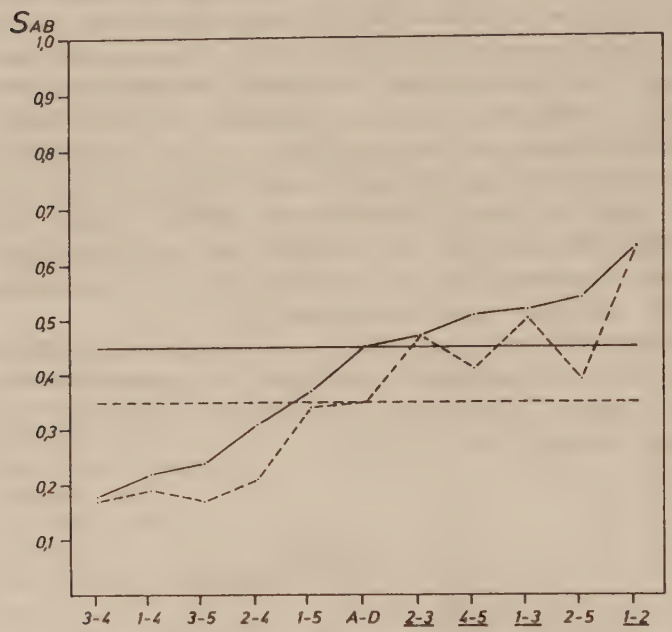


Abb.17: S_{AB}-Werte der paarweise verglichenen Bäume. Die horizontalen Linien zeigen den S_{AB}-Wert der Standorte an, bei unterstrichenen Paaren stammen beide Bäume vom selben Standort.

——— S_{AB} mit allen Arten berechnet
— — S_{AB} ohne die häufigsten Arten berechnet (siehe Text)

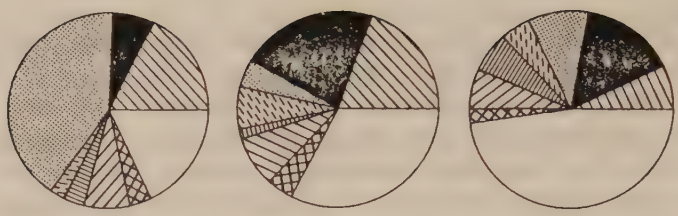
Die S_{AB}-Werte der Bäume desselben Standortes liegen zwischen 0,47 und 0,63, das heißt, sie weisen trotz einer Schwankungsbreite von 0,16 mehr gemeinsame Endophytenarten auf als Bäume verschiedener Standorte. Die einzige Ausnahme stellt das Baumpaar 2/5 dar, das mit einem S_{AB}-Wert von 0,54 mehr gleiche Arten aufweist als die Standorte insgesamt gesehen. Die beiden Standorte "Arber" und "Deisenhofen" haben nur 45% aller Arten gemeinsam, obwohl die Gesamtartenzahl, wie oben schon erwähnt annähernd gleich ist.

---

* S_{AB}-Wert: vgl. Abschnitt 2.1.5

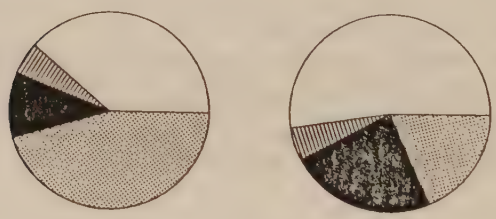
Der S_{AB}-Wert wird stark von den oben genannten dominierenden Arten beeinflußt. Die Berechnung ohne diese Arten (*L. piceae*, *T. parca*, *S. myrtilli*, *Xylaria spp.*, *Geniculosporium spp.*, *Nodulisporium spp.*) liefert Werte, die erwartungsgemäß tiefer liegen, den Ergebnissen der Berechnung für alle Arten aber nicht widersprechen, wenngleich sich die Reihenfolge in der Zunahme der Ähnlichkeit (=steigender S_{AB}-Wert) vor allem bei den Bäumen gleicher Standorte verändert. Das Baumpaar 2/5 fällt immer noch aus der Reihe, liegt aber jetzt dem S_{AB}-Wert der Standorte viel näher.
Abb.17 zeigt, daß nicht nur bei den dominierenden sondern auch bei den seteneren oder den sporadisch auftretenden Arten die Unterschiede zwischen den Standorten größer sind als innerhalb der Standorte.

Die Häufigkeit der Arten und damit ihr Anteil am Gesamtbefall bleibt beim S_{AB}-Wert, wie in Abschnitt 2.1.5 bereits erwähnt, unberücksichtigt. So können zwischen den Bäumen des gleichen Standortes trotz der Gemeinsamkeiten im Artenspektrum erhebliche Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung bestehen.



Baum 1 Baum 2 Baum 3 **Arber**

	Baum 1	Baum 2	Baum 3
Lophodermium piceae	17,7	19,8	7,1
Sirococcus myrtilli	7,0	22,1	15,5
Tiarosporella parca	40,8	4,6	9,5
Rhinocladiella sp.	2,4	6,9	4,8
Rhizosphaera kalkhoffii	3,4	1,7	6,5
Coniothyrium fuckelii	7,4	8,3	6,5
Sclerophoma pithyophila	3,6	4,3	2,4
übrige Arten	17,7	32,3	47,6



Baum 4 Baum 5 **Deisenhofen**

	Baum 4	Baum 5
Xylaria spp.	5,3	5,5
Geniculosporium spp.	10,7	23,8
Nodulisporium spp.	45,3	18,3
übrige Arten	38,7	52,4

Abb.18: Relative Anteile der häufigsten Arten an der Gesamtzahl der Endophytenisolate (in%).

Bei der Betrachtung der einzelnen Bäume (Abb.18) dominiert *T. parca* mit 40,8% in Baum 1 eindeutig und hat in Baum 2 und 3 wenig bis keine Bedeutung. *L. piceae* hat trotz der Extrema von *T. parca* in Baum 1 und 2 mit knapp 20% den gleichen Anteil am Befall. Das Fehlen von *T. parca* in Baum 2 wird durch eine relative Zunahme von *S. myrtilli* und den "übrigen Arten" ausgeglichen.
Baum 3 ist wegen der kürzeren Untersuchungsdauer nur bedingt vergleichbar. Knapp die Hälfte des Befalls (47,6%) ist auf Arten zurückzuführen, die nur vereinzelt und selten auftreten. *S. myrtilli* konnte mit 15,6% Anteil zwar am häufigsten isoliert werden, eine dominierende Rolle spielt diese Art bezogen auf den Gesamtbefall von Endophyten jedoch nicht.

2.2.5 Zahl der Arten in Abhängigkeit von der Jahreszeit

Die Anzahl der Arten am Arber (Abb.19) weist in ihren monatlichen Schwankungen nur eingeschränkt Ähnlichkeiten mit der Befallsdichte (Abb.6) auf. Der Rückgang der Artenzahl im August fällt geringer aus als die Befallsdichte, der sommerliche Maximalbereich (Juni bis September) ist daher länger als bei der Befallskurve. Eine deutliche Übereinstimmung ist aber im Oktober-Minimum erkennbar.

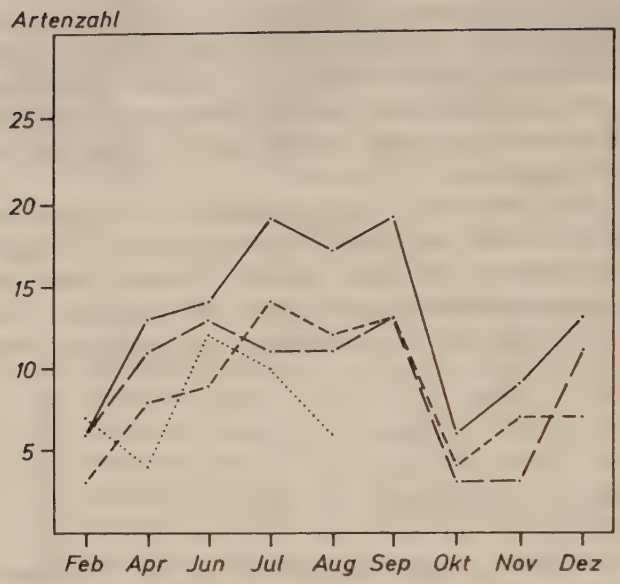


Abb.19: Anzahl der Arten pro Monat am Arber.
—·— Baum 1 - - - - Baum 2 ····· Baum 3 ——— Standort

Die Kurven der Bäume 1 und 2 sind in ihrem Verlauf der Kurve der Gesamtartenzahl am Standort ähnlich. Die Gesamtartenzahl am Standort liegt aber, im Gegensatz zu Frühjahr und Herbst, in den Sommermonaten (Juli bis September) deutlich höher als die Artenzahl der einzelnen Bäume. Das heißt, daß die Artenvielfalt und die Unterschiedlichkeit der Artenspektren der Einzelbäume in der Vegetationsperiode ihren Höhepunkt erreichen. Bei konstanten Unterschieden würde die Kurve der Gesamtartenzahl parallel zu den Kurven der Einzelbäume verlaufen, bei Gleichheit der Artenspektren aller Bäume wären alle Kurven identisch. Die starken Schwankungen der Klimawerte wirken sich auf die Anzahl der Arten nur geringfügig aus.

In Deisenhofen nimmt nach einem Maximum im Juni und Juli die Gesamtzahl der Arten konstant ab (Abb.20). Von Mai bis September ist die Artenzahl der beiden Bäume stark schwankend und unterschiedlich groß. Die Gesamtzahl der Arten und die Artenzahlen der Einzelbäume nähern sich einander von September bis November an. Das deutet in dieser Zeit

auf eine Zunahme der Ähnlichkeit in den Artenspektren der Einzelbäume hin.

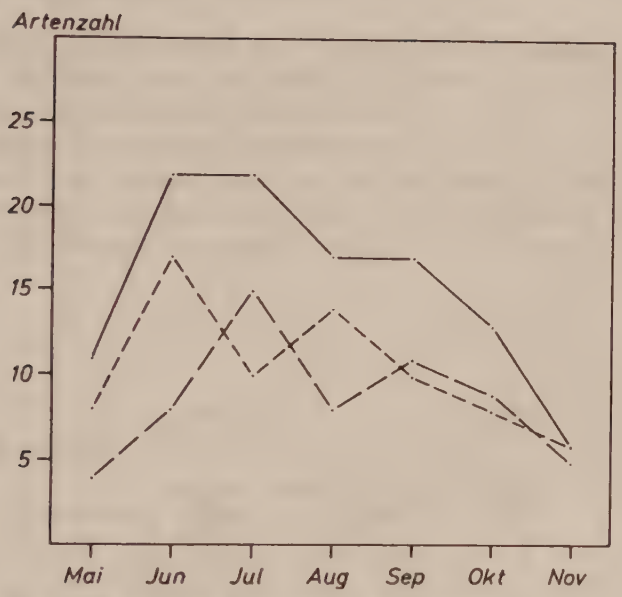


Abb.20: Anzahl der Arten pro Monat in Deisenhofen.
—— Baum 4 ---- Baum 5 ——— Standort

2.2.6 Zahl der Arten in den Nadeljahrgängen

Auch in der Abhängigkeit der Artenzahl vom Nadelalter verhalten sich die Standorte unterschiedlich:
Am Arber ist mit 20 - 22 Arten die höchste Artenzahl in den Nadeln mittleren Alters (3. - 7.Jg.) zu finden (Abb.21). Aus jungen (1. und 2.Jahrg.) und alten Nadeln (8. - 10.Jahrg.) konnten wesentlich weniger Arten isoliert werden.
In Deisenhofen weisen schon die jungen Nadeln eine höhere Artenvielfalt als am Arber auf (Abb.22). Erst nach dem 6.Jahrgang (21 Arten) nimmt die Anzahl (nach einer nur leichten Zunahme) rasch ab.

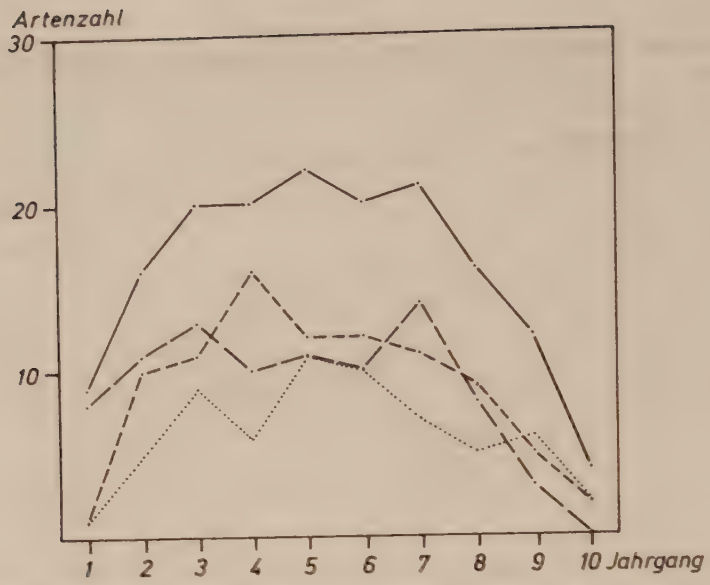


Abb.21: Anzahl der Arten pro Nadeljahrgang am Arber.
— — Baum 1 - - - - Baum 2 ..... Baum 3 ——— Standort

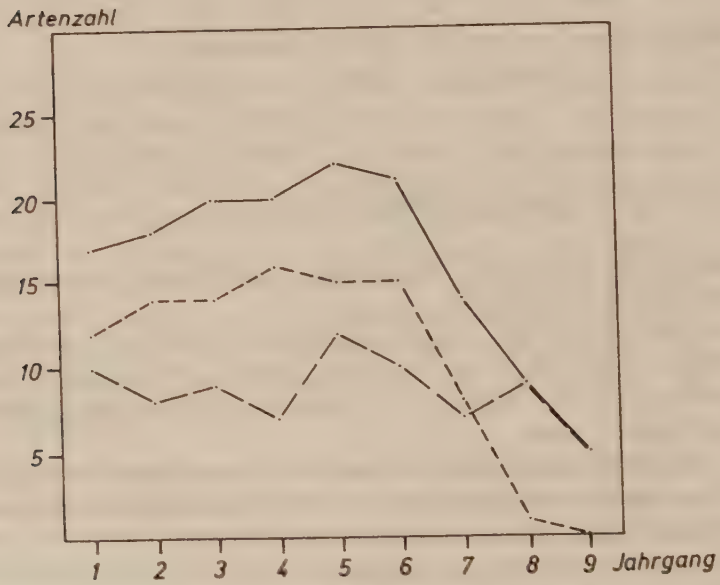


Abb.22: Anzahl der Arten pro Nadeljahrgang in Deisenhofen.
— — Baum 4 - - - - Baum 5 ——— Standort

Betrachtet man an beiden Standorten die Anzahl der Arten monatsweise in den Nadeljahrgängen (Abb.23 und 24), spiegelt sich annähernd das Bild der Befallshäufigkeit wieder (Abb.14 und 15).

Am Arber sind die meisten Arten in den mittleren Jahrgängen (Jahrg. 3 – 7) zu finden, wobei die größte Artenvielfalt, wie schon in Abb.19 dargestellt, von Juni bis September auftritt.
Die Bäume des Standortes Deisenhofen weisen eine relativ uneinheitliche Verteilung der Artenzahl auf, wenn man den Verlauf der Artenzahl innerhalb eines Jahrgangs von Monat zu Monat oder innerhalb eines Monats von Jahrgang zu Jahrgang verfolgt.

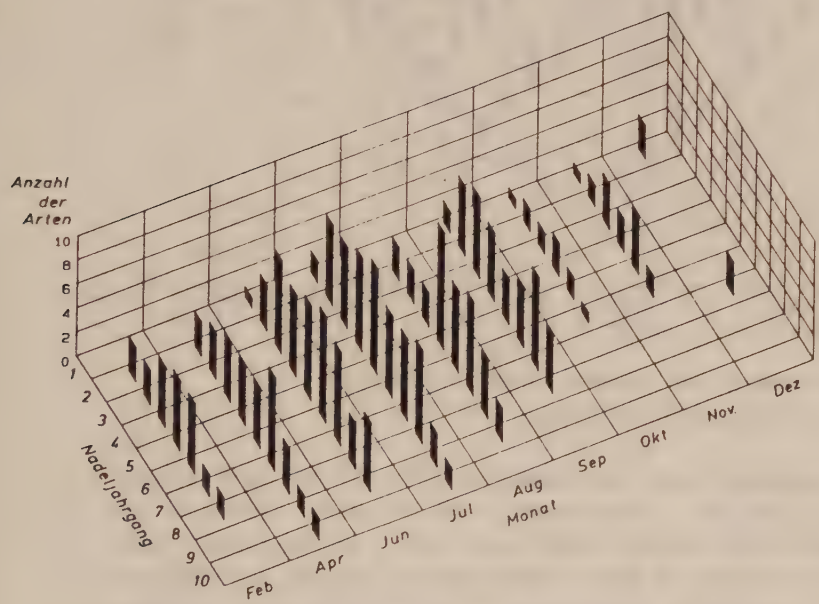


Abb.23: Anzahl der Arten pro Monat und Nadeljahrgang am Arber.

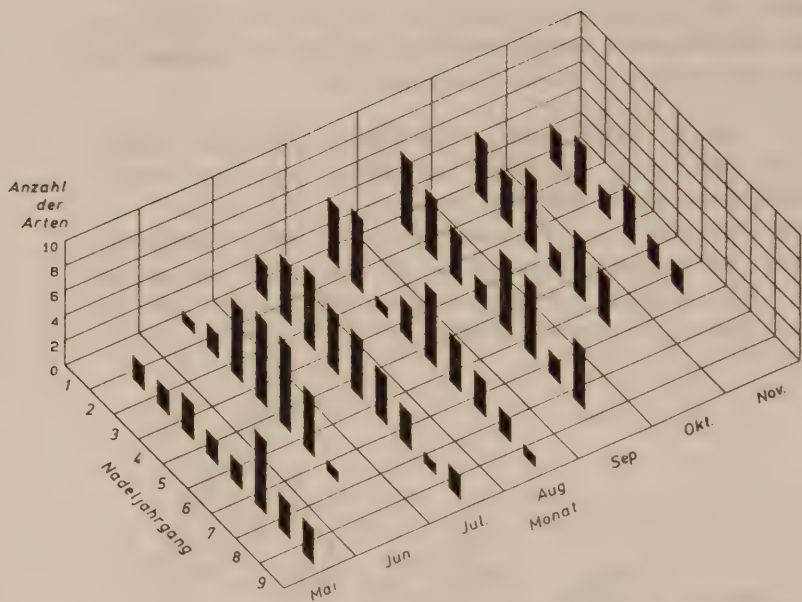


Abb.24: Anzahl der Arten pro Monat und Nadeljahrgang in Deisenhofen.

2.2.7 Verteilung der häufigsten Arten in Abhängigkeit von Jahreszeit und Nadeljahrgang

Der monatliche Verlauf des Endophytenbefalls wird am Arber vor allem von *T. parca* und *L. piceae* bestimmt. Die drei starken Maxima im Juni, September und November (Abb.6) finden sich in der monatlichen Verteilung von *T. parca* in Baum 1 wieder (Abb.25). Die Zahl der Isolierungen von *L. piceae* weist im monatlichen Verlauf in Baum 1 und 2 die gleichen Maxima in Juni/ Juli und Oktober auf (Mittel aus allen Nadeljahrgängen), *T. parca* spielt dagegen in Baum 2 keine Rolle, da der Pilz nur im Februar vierzehnmal isoliert werden konnte (Abb.26). Bei Baum 3 ist bis zum Abbruch der Probenahmen im August ein Juni/Juli - Maximum von *L. piceae*, *T. parca* und *S. myrtilli* zu beobachten (Abb.27). In der Häufigkeit unterscheiden sich die Arten nur unwesentlich.

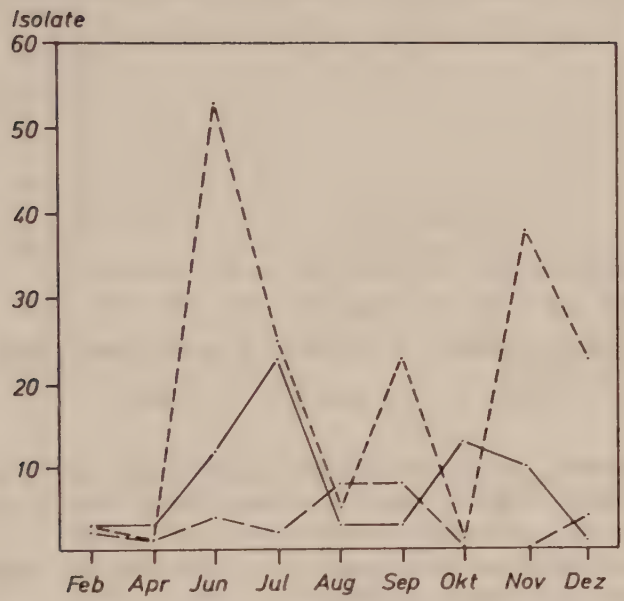


Abb.25: Monatliche Verteilung von *L. piceae*, *S. myrtilli* und *T. parca* in Baum 1 (Arber). ——— *L. piceae* —·—·— *S. myrtilli* - - - - *T. parca*

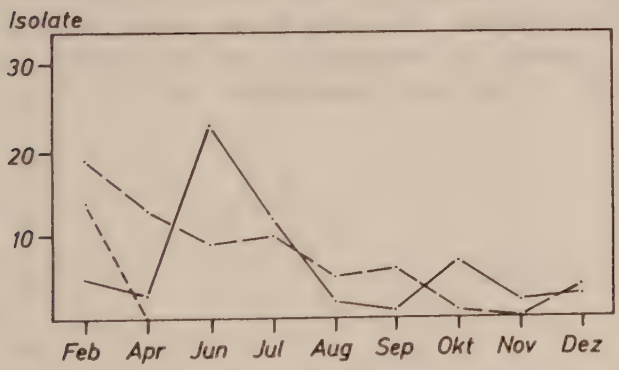


Abb.26: Monatliche Verteilung von *L. piceae*, *S. myrtilli* und *T. parca* in Baum 2 (Arber).
——— *L. piceae* —·—·— *S. myrtilli* - - - - *T. parca*

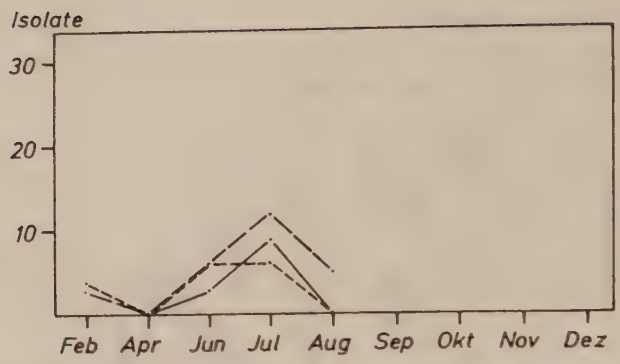


Abb.27: Monatliche Verteilung von *L. piceae*, *S. myrtilli* und *T. parca* in Baum 3 (Arber).
——— *L. piceae* —·— *S. myrtilli* - - - - *T. parca*

Die unterschiedliche Befallsdichte der Bäume in Deisenhofen (Abb.7) wird durch *Nodulisporium spp.* in Baum 4 und *Geniculosporium spp.* in Baum 5, beides *Hypoxylon*-Anamorphe, hervorgerufen (Abb.28 und 29).
Trotz der offensichtlichen Unterschiede in der Artenverteilung beider Bäume ist eine Gemeinsamkeit feststellbar:
Die jeweils am stärksten vertretene Gattung weist eine eingipfelige Verteilung auf, deren Maximum in der Befallskurve (Abb.7) wiederzufinden ist; so hat Baum 4 im September ein *Nodulisporium*- und Baum 5 im Juli ein *Geniculosporium*-Maximum. Die weniger häufige Gattung tritt in einer zweigipfeligen Verteilung mit Höhepunkten in Juli und September (*Geniculosporium*) bzw. Juni und August (*Nodulisporium*) auf.

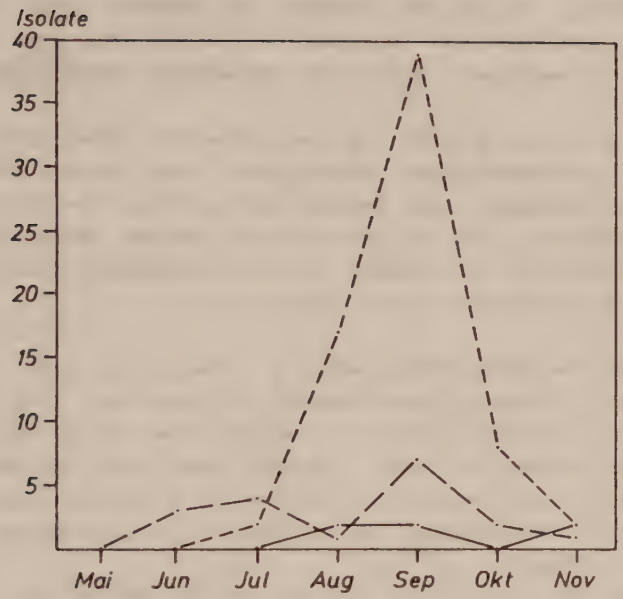


Abb.28: Monatliche Verteilung von *Xylaria*, *Geniculosporium* und *Nodulisporium* in Baum 4 (Deisenhofen).

—·— *Geniculosporium* - - - *Nodulisporium* ——— *Xylaria*

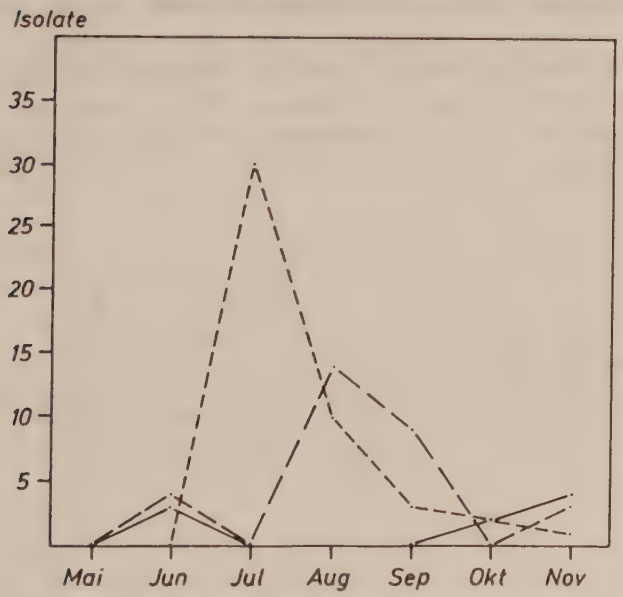


Abb.29: Monatliche Verteilung von *Xylaria*, *Geniculosporium* und *Nodulisporium* in Baum 5 (Deisenhofen).

- - - *Geniculosporium* —·— *Nodulisporium* ——— *Xylaria*

Um herauszufinden, ob sich das Vorkommen der häufigsten Arten auf Nadeln eines bestimmten Alters beschränkt und ob sich diese Arten in ihrer Häufigkeit beeinflussen, wurden auch die einzelnen Nadeljahrgänge untersucht.
T. parca, *L. piceae* und *S. myrtilli*, die drei dominierenden Arten am Arber, sind in den Nadeljahrgängen unterschiedlich stark vertreten. Die Verteilung der Häufigkeiten weist Parallelen mit dem Verlauf des Mittleren Trockenheitsindexes MTI der Jahre 1976 bis 1986 auf (Abb.4), ein Ergebnis, das sich schon beim Pilzbefall in den Nadeljahrgängen (Abb.12) in der Zäsur beim 4.Jahrgang (=1983) gezeigt hat.

Betrachtet man die Bäume einzeln, zeigen *L. piceae* und *S. myrtilli* in Baum 2 (Abb.31) auffallende Gemeinsamkeiten im Kurvenverlauf und in der Häufigkeit. Beide Arten weisen im 4. Jahrgang einen starken Rückgang auf und erreichen im 6. bzw. 7. Jahrgang wieder einen Maximalwert. Abgesehen von dem sporadischen Auftreten im 4. Jahrgang taucht *T. parca* erst im 7. Nadeljahrgang auf und erreicht bei den achtjährigen Nadeln seinen Höhepunkt.
Ähnlich verhält sich *T. parca* auch in Baum 1 (Abb.30). Der Pilz tritt im 6. Nadeljahrgang mit 52 Isolaten (Jahressumme) eindeutig am häufigsten auf. *L. piceae* besiedelt vorwiegend den 2. - 5. Nadeljahrgang und *S. myrtilli* ist nach einer Häufung im 2. Jahrgang (10 Isolate; Jahressumme) nur noch in den fünf- bis siebenjährigen Nadeln schwach vertreten.
Bei Baum 3 ist wegen der geringeren Anzahl der Stichproben eine Interpretation der Kurven nur schwer durchführbar. Für *L. piceae* und *S. myrtilli* ist jedoch vom 5. bis 7. Nadeljahrgang eine leichte Zunahme zu verzeichnen (Abb.32).

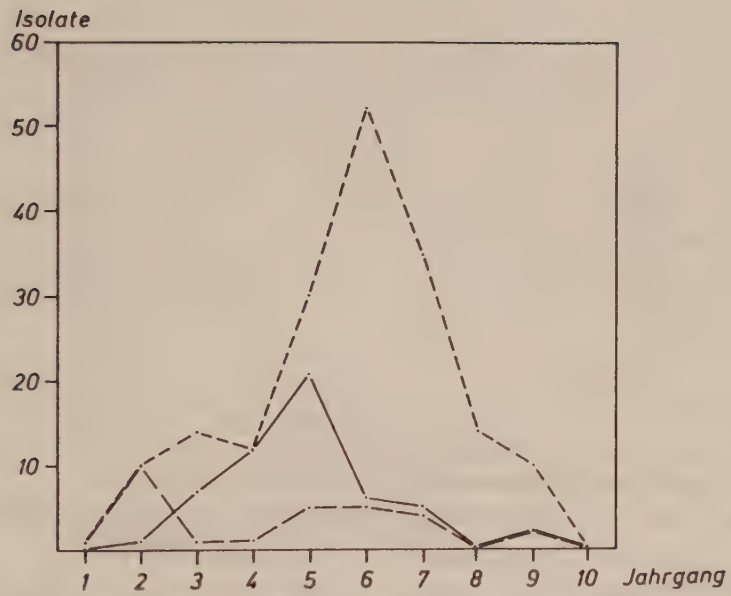


Abb.30: Verteilung von *L. piceae*, *S. myrtilli* und *T. parca* pro Nadeljahrgang in Baum 1 (Arber).
——— *L. piceae* —·—·— *S. myrtilli* - - - - *T. parca*

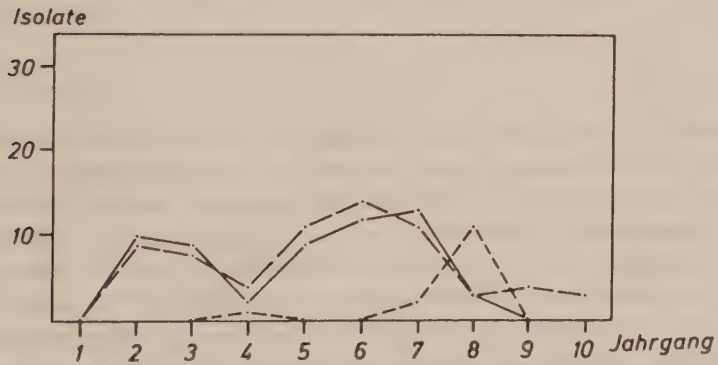


Abb.31: Verteilung von *L. piceae*, *S. myrtilli* und *T. parca* pro Nadeljahrgang in Baum 2 (Arber).
——— *L. piceae* —·—·— *S. myrtilli* - - - - *T. parca*

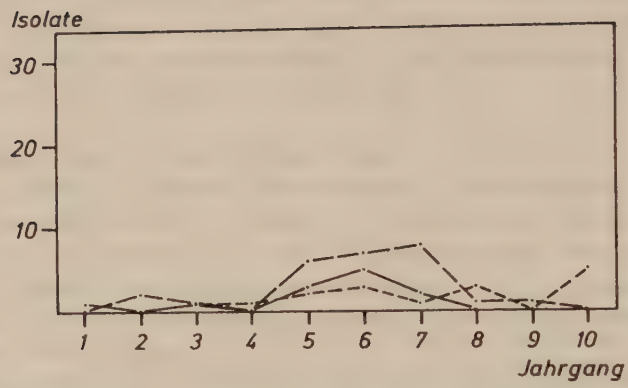


Abb.32: Verteilung von *L. piceae*, *S. myrtilli* und *T. parca* pro Nadeljahrgang in Baum 3 (Arber).
——— *L. piceae* —·— *S. myrtilli* - - - - *T. parca*

In Baum 4 in Deisenhofen tritt *Nodulisporium* mit zwei Spitzen in den drei- und siebenjährigen Nadeln auf und ist in allen Jahrgängen eindeutig am meisten vertreten (Abb.33). *Geniculosporium* besiedelt während des Juli-Maximums in Baum 5 vor allem die jungen (1. und 2.Jahrgang) und die Nadeln mittleren Alters (4. und 5.Jahrgang) und ist innerhalb der Jahrgänge nicht so dominierend wie *Nodulisporium* in Baum 4 (Abb.34). In Baum 5 kann weder zwischen *Nodulisporium*, *Geniculosporium* und *Xylaria* ein Zusammenhang erkannt werden, noch zwischen der Verteilung dieser drei Gattungen und dem MTI.

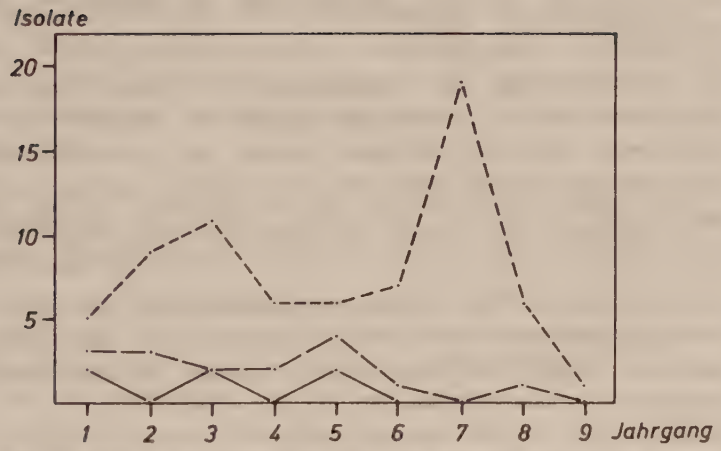


Abb.33: Verteilung von *Geniculosporium*, *Nodulisporium* und *Xylaria* pro Nadeljahrgang in Baum 4 (Deisenhofen).
—·— *Geniculosporium* - - - - *Nodulisporium* ——— *Xylaria*

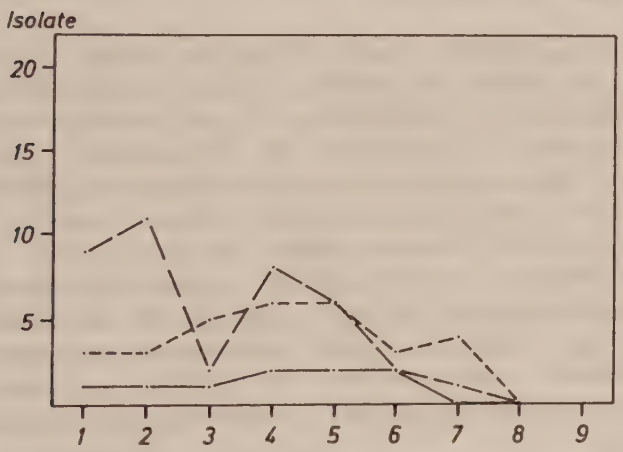


Abb.34: Verteilung von *Geniculosporium*, *Nodulisporium* und *Xylaria* pro Nadeljahrgang in Baum 5 (Deisenhofen).
—·— *Geniculosporium* - - - - *Nodulisporium* ——— *Xylaria*

Die Gegenüberstellung der Zahl der Endophytenisolate und der Arten mit der Verteilung der dominierenden Arten jeweils in Abhängigkeit von Monat und Nadelalter soll zeigen, welchen Einfluß die dominierenden Arten auf die Endophytenflora haben:

Die monatliche Anzahl der Endophytenisolate in **Baum 1** am **Arber** (Abb.6) wird stark von *T. parca* bestimmt (Abb.25). Bei **Baum 2** ist das Juni-Maximum (Abb.6) auf das starke Auftreten von *L. piceae* zurückzuführen (Abb.26). In **Baum 3** geht mit der monatlichen Zunahme von Isolaten (Abb.6) ein Ansteigen der Artenzahl (Abb.19) und der Häufigkeit der dominierenden Arten *L. piceae*, *S. myrtilli*, *T. parca* (Abb.27) einher.

Das starke Auftreten von *T. parca* in Nadeljahrgängen 5-7 (**Baum 1**) (Abb.30) spiegelt sich in der Zahl der Endophytenisolate pro Nadeljahrgang wieder (Abb.12), ein Einfluß auf die Artenzahl in diesen Jahrgängen (Abb.21) ist nicht feststellbar.
In **Baum 2** nimmt die Zahl der von Endophyten befallenen Nadeln im 4. Nadeljahrgang (Abb.12) ab, während im selben Jahrgang die Artenzahl zunimmt (Abb.21). Die Ursache ist ein Rückgang in der Häufigkeit der dominierenden Arten *L. piceae* und *T. parca* (Abb.31) und ein nur sporadisches Auftreten der übrigen Arten.

Bei **Baum 4** in **Deisenhofen** ist das Maximum der Artenzahl im Juli (Abb.20) auf die Zunahme der sporadisch auftretenden Arten zurückzuführen. Deshalb wirkt sich diese Zunahme kaum auf die Anzahl der Endophytenisolate aus (Abb.7). Im September ist neben der großen Zahl von *Nodulisporium*-Isolaten (Abb.28) eine Zunahme der Artenzahl erkennbar (Abb.20), die aber geringer als im Juli ausfällt.
In **Baum 5** ist während des Juli-Maximums von *Geniculosporium spp.* (Abb.29) ein Rückgang der Artenzahl (Abb.20) zu beobachten. Das niedrigere *Nodulisporium*-Maximum im August deckt sich mit einer Abnahme der nur sporadisch auftretenden übrigen Arten (Abb.20). Eine Zunahme der Endophytenisolate (Abb.7) ist daher nicht feststellbar.
In Abhängigkeit vom Nadeljahrgang sind in **Deisenhofen** keine Zusammenhänge sichtbar.

2.3 Endophytenbesatz in Platten- und Kammfichten

Im vorangehenden Abschnitt wurde die Abhängigkeit der Endophytenflora von der Jahreszeit und dem Nadelalter untersucht. Nicht berücksichtigt wurde der Einfluß morphologischer Parameter in der Oberkrone von Platten- und Kammfichten auf eventuell unterschiedliche "Auskämmwirkungen" für Pilzsporen.

Es stellt sich die Frage, wie stark die unterschiedliche Wuchsform freistehender Platten- und Kammfichten die Verteilung der Endophyten in der Krone beeinflußt.
Können die senkrecht herabhängenden Zweige zweiter Ordnung der Kammfichten mehr Sporen aus der Luft bzw. Nebel "herauskämmen" als die mehr oder weniger waagerechten Zweige der Plattenfichten?
Bildet sich ein "Befallsgefälle" von Luv nach Lee aus?

2.3.1 Material und Methoden

2.3.1.1 Standorte

Bei Altfichten ist die Ausprägung des Platten- und Kammtyps am deutlichsten (PRIEHÄUSSER, 1958; RUBNER, 1936). Für die Entnahme von Probematerial wurden deshalb je ein ca. hundertjähriger Fichtenbestand am Großen Arber (FoA Bodenmais) und im Höhenkirchner Forst (FoA Sauerlach) ausgesucht, die Bäume mit beiden Verzweigungsformen aufweisen (Tab.6). An beiden Standorten waren die Probebäume so weit freistehend, daß sie vom Wind durchströmt werden konnten ohne durch Luftwirbel von Nachbarbäumen beeinflußt zu werden.
Die Ansprache der Verzweigungstypen erfolgte in Bodenmais nach eigenen Beobachtungen. Für Sauerlach wurde die Einteilung von MAURER (1987) übernommen.
Die Lage der Probeflächen und die Bestandsdaten sind in Abb.1 und Tab.6 zusammengefaßt bzw. dargestellt.

Forstamt Forstort	Sauerlach Distr. Brunndicket Abt. Hohenbrunnen,Ger.	Bodenmais Distr. Hochwald Abt. Luchsplatzl
Standort Lage ü.NN Neigung	75m eben	200m schwach nach SW
Boden Ausgangs- gestein Bodenart Bodentyp	Fluvioglazialer Kalkschotter mäßig trockner Lehm schwach podsolige Parabraunerden	Periglazialer Paragneisschutt podsolige Braunerde
Bestand Zusammensetzung Alter Frühere Nutzung Eingriffe	Fichte 94% Kiefer 6% 100 Jahre alter Wald normal durchforstet	Fichte 100% 105 Jahre nicht bekannt Kahlfläche vor der Pflanzung

Tab.6: Bestandsdaten der Probeorte Bodenmais und Sauerlach.

2.3.1.2 Zeitpunkt und Umfang der Probenahme

Die Probenahme erfolgte in Bodenmais Mitte September 1986, in Sauerlach aus technischen Gründen erst im September des folgenden Jahres. Ausgehend von der Hauptwindrichtung "West" (WETTERAMT MÜNCHEN) wurde von den Versuchsbäumen beider Standorte (Bodenmais: 5 Platten-, 8 Kammfichten; Sauerlach je 5 Platten- und Kammfichten) je ein nord und ein südexponierter Ast aus dem 7.Quirl (ca.25-30m Höhe) entnommen. Von beiden Ästen wurden insgesamt je 30 Nadeln des 3. Jahrgangs von der Luv- und der Leeseite (=West- und Ostseite) entnommen (Abb.35).

Die Isolierung und Bestimmung der Endophyten wurde, wie unter Abschnitt 2.1.3 und 2.1.4 beschrieben, durchgeführt.

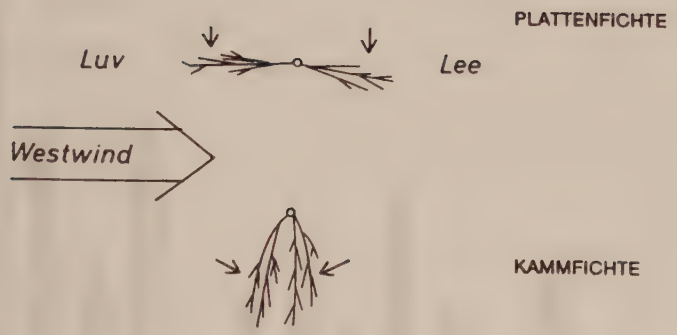


Abb.35: Zweige von Platten- und Kammfichte mit Stelle der Probenahme (Pfeil) und Angabe der Exposition.

2.3.2 Ergebnisse

2.3.2.1 Befallshäufigkeit

Die Gegenüberstellung der Einzelbaumergebnisse (Abb:36,37) zeigt bei Kammfichten - mit Ausnahme von Baum 12 - Luv stets einen höheren Anteil pilzbefallener Nadeln als auf der Leeseite. Beim Plattentyp ist kein so eindeutiges Ergebnis erkennbar. Es überwiegen die Fälle mit höherem Lee-Befall (7 Fälle) und Gleichheit beider Seiten (2 Fälle). Einmal ist Luv eine deutlich höhere Befallsrate als Lee zu verzeichnen.

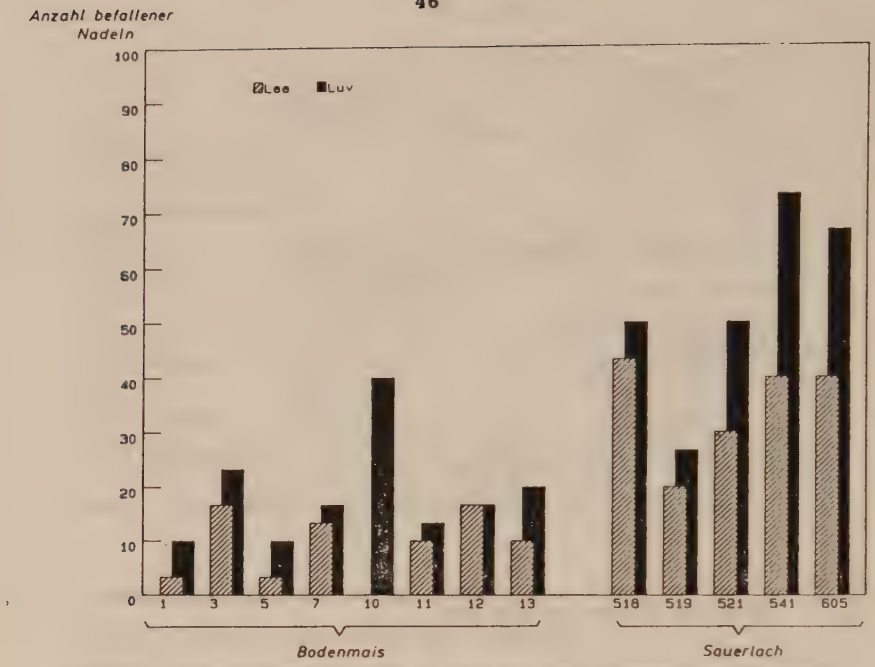


Abb.36: Anzahl befallener Nadeln auf Luv- und Leeseite der Kammfichten (% bezogen auf die Zahl der untersuchten Nadeln).

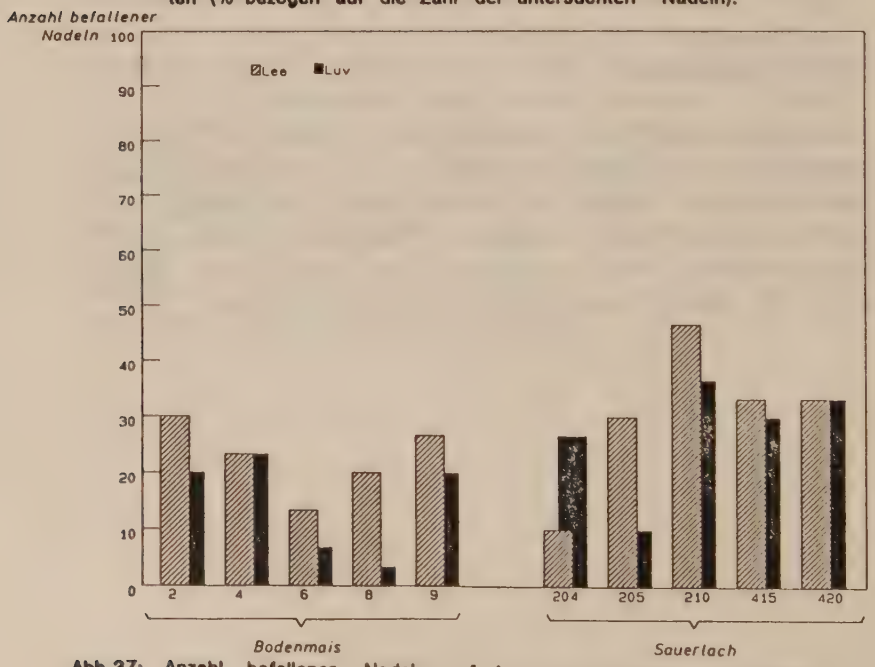


Abb.37: Anzahl befallener Nadeln auf Luv- und Leeseite der Plattenfichten (% bezogen auf die Zahl der untersuchten Nadeln).

Standort	Bodenmais 1986							Sauerlach 1987						
Fichtentyp	Platte			Kamm			insg.	Platte			Kamm			insg.
Seite	lee	luv	x̄	lee	luv	x̄		lee	luv	x̄	lee	luv	x̄	
untersuchte Nadeln	150	150		240	240		780	150	150		150	150		600
infizierte Nadeln	34	22	28	22	45	33,5	123	48	42	45	52	78	65	220
%-Befall	22,7	14,7	18,7	9,2	18,8	14	15,8	32	28	30	34,7	52	43,4	36,7
Zahl der isolierten Arten	10	10	10	8	14	11	21	20	16	18	16	11	13,5	34

Tab.7: Anzahl der Endophytenisolate und Arten in Platten- und Kammfichten der Probeorte Bodenmais und Sauerlach. x̄=Mittelwert aus Luv und Lee

	Platte		Kamm		insg.
	lee	luv	lee	luv	
untersuchte Nadeln	300	300	390	390	1380
infizierte Nadeln	82	64	74	123	343
%-Befall	27,3	21,3	19	31,5	24,9
Zahl der isolierten Arten	24	22	17	22	40

Tab.8: Anzahl der Endophytenisolate und Arten in Platten- und Kammfichten beider Probeorte zusammen.

Die Zusammenfassung der Einzelbaumergebnisse nach Standorten getrennt (Tab.7), und auch die gemeinsame Darstellung beider Standorte (Tab.8) zeigt bei Kammfichten ein deutliches Luv-Lee-Gefälle, während die Fichten des Plattentyps ein konträres, wenn auch weniger stark ausgeprägtes Gefälle aufweisen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse mit dem U-Test bestätigt für die Kammfichten die Erwartung, daß in Luv ein signifikant größerer Teil der Nadeln von Endophyten besiedelt wird, als in Lee. Bei den Plattenfichten kann ein Trend in der Infektionsdichte nicht signifikant nachgewiesen werden (Tab.9).

	Platte	Kamm
Bodenmais	0,0679	0,0180*
Sauerlach	0,4652	0,0431*
beide Standorte	0,1073	0,0022**

Tab.9: Vergleich der Unterschiede von luv- und leeseitiger Endophytenzahl mit dem U-Test (P-Werte).

Vergleicht man die Mittelwerte aus luv- und leeseitigem Endophytenbefall beider Baumtypen, kann man in Sauerlach feststellen, daß der Kammtyp (43,4%) stärker als der Plattentyp (30%) befallen ist (Tab.7). Der luvseitige Befall der Kammfichten liegt deutlich über dem der Plattenfichten, während Lee bei beiden Typen fast gleich ist.
Auch wenn in diesen Ergebnissen keine signifikanten Beziehungen feststellbar sind (Tab.10), ist ein Trend erkennbar, der mit der Theorie in Einklang steht, Kammfichten würden zum einen mehr Pilzsporen aus der Luft "kämmen" als Plattenfichten und zum anderen wegen der größeren dem Wind zugewandten Fläche luvseitig mehr befallen sein als der Plattentyp auf der gleichen Seite.

	LEE	LUV	Mittel
Bodenmais	0,0104**	0,7144	0,2134
Sauerlach	0,6761	0,0601	0,0758
beide Standorte	0,1538	0,3522	0,7098

Tab.10: Vergleich der beiden Lee- bzw. Luvseiten sowie der Mittelwerte($\bar{x}$) aus beiden Seiten von Platten- und Kammfichten mit dem H-Test (P-Werte).

In **Bodenmais** stimmt ein höherer Luv-Befall der **Kammfichten** mit den Sauerlacher Befunden überein. Der leeseitige Befall der **Plattenfichten** ist jedoch signifikant höher als beim Kammtyp (Tab.7 und 10). Auch das Mittel aus luv- und leeseitigem Befall liegt bei den **Plattenfichten** (18,7%) höher als bei den **Kammfichten** (14%). Das heißt, in **Bodenmais** sind die **Plattenfichten** stärker von Endophyten befallen als die **Kammfichten**.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aus beiden Standorten (Tab.8) ergibt zwar die gleiche Häufigkeitsverteilung wie in Sauerlach, erkennbare Trends werden aber von den Ergebnissen aus Bodenmais verwischt und sind deshalb in der statistischen Auswertung nicht mehr sichtbar (Tab.10).

2.3.2.2 Verteilung der Arten

Aus 1380 untersuchten Nadeln konnten 40 Endophytenarten isoliert werden (Tab.8).
Die dominierenden Arten in **Sauerlach** stammen ausschließlich aus der Familie der *Xylariaceae* (Tab.11). In **Bodenmais** ist hingegen *Lophodermium piceae* mit 30 Isolaten die häufigste Art vor *Aureobasidium pullulans* (21 Isolate) und *Nodulisporium sp.3* (15 Isolate), erreicht damit aber nicht die Bedeutung, die diesem Pilz in der Literatur (BUTIN 1986, BARKLUND 1987) zugeschrieben wird.
Die in **Sauerlach** dominierenden *Xylariaceae* waren überwiegend auf der Luvseite der **Kammfichten** zu finden. In **Bodenmais** konnte kein Trend in der Verteilung der häufigsten Arten erkannt werden. Auch *Nodulisporium*

sp.3 konnte auf Luv- und Leeseite gleich oft isoliert werden. Alle übrigen Arten traten an beiden Standorten nur sporadisch auf. Die bevorzugte Besiedelung einer Seite war bei diesen Arten daher nicht feststellbar (Tab.11).

	Bodenmais 1986					Sauerlach 1987				
Pilzspezies	Platte		Kamm		insg.	Platte		Kamm		insg.
	lee	luv	lee	luv		lee	luv	lee	luv	
ASCOMYCETES										
Nectria fuckeliana	1				1					
Pezicula livida						1			1	2
Sclerotinia sp.						1				1
Sordaria fimicola		2	2	4	8	3		1		4
Xylaria hypoxylon								2	1	3
Xylaria spp.		1			1	1		4	16	21
DEUTEROMYCETES										
HYPHOMYCETES										
Alternaria alternata	2	2	1	5	10	1		1		2
Aureobassidium pullulans	9	1	3	8	21	1		1	1	3
Candida friedrichii (CBS)							2			2
Cladosporium cladosporioides		1		5	6	2				2
Cylindrocarpon sp.								1		1
Drechslera spicifera						2				2
Epicoccum purpurascens	1	1			2		2			2
Geniculosporium serpens						8	11		3	22

Tab.11: Endophytenisolate aus Platten- und Kammfichten der Standorte Sauerlach und Bodenmais.

Pilzspezies	Bodenmais 1986					Sauerlach 1987				
	Platte		Kamm		insg.	Platte		Kamm		insg.
	lee	luv	lee	luv		lee	luv	lee	luv	
Geniculosporium sp.						2	2	22	31	57
Nodulisporium sp.1 (CBS)		1	3	3	7	7	4	8	4	23
Nodulisporium sp.2 (CBS)						6	2	3	16	27
Nodulisporium sp.3	5	5	3	2	15			2		2
Rhinocladiella sp. (CBS)	1			2	3	1		1		2
Thysanophora penicilloides							1	1		2
Trichoderma viride							1			1
Trichothecium roseum							1			1
Verticicladium trifidum						1	2	1		4
Virgariella sp.				1	1					
COELOMYCETES										
Ceuthospora sp.				1	1				2	2
Cryptosporiopsis abietina								2		2
Cytospora pinastri							1			1
Cytospora sp.	1				1					
Gelatinosporium sp.				1	1					
Leptostroma (T: *Lophodermium macrosporum*							2			2
Leptostroma (T: *Lophodermium piceae*)	11	4	7	8	30	2	5	1		8

Tab.11: Fortsetzung

	Bodenmais 1986					Sauerlach 1987				
Pilzspezies	Platte		Kamm		insg.	Platte		Kamm		insg.
	lee	luv	lee	luv		lee	luv	lee	luv	
Phoma sp.							1			1
Phomopsis conorum									2	2
Phomopsis sp.	1				1	2				2
Pracmopycnis sp.				1	1					
Rhizosphaera kalkhoffii			1		1	1		1	1	3
Sclerophoma pithyophila						1	1			2
Sirococcus myrtilli		3	1	1	5	1	2			3
Sirococcus strobilinus	1				1	1				1
Tiarosporella parca				1	1					
sonstige	1	1	1	2	5	3	2	5		

Tab.11: Fortsetzung

Ein statistisch abgesichertes Luv-Lee-Gefälle der Artenzahl ist nur bei den Kammfichten in Bodenmais erkennbar (Tab.7 und 12, Abb.38). In Sauerlach ist der Trend konträr und die Differenz zwischen beiden Seiten geringer als in Bodenmais (Tab.7).
Die Plattenfichten beider Standorte weisen kein statistisch absicherbares Gefälle auf (Tab.12, Abb.39).

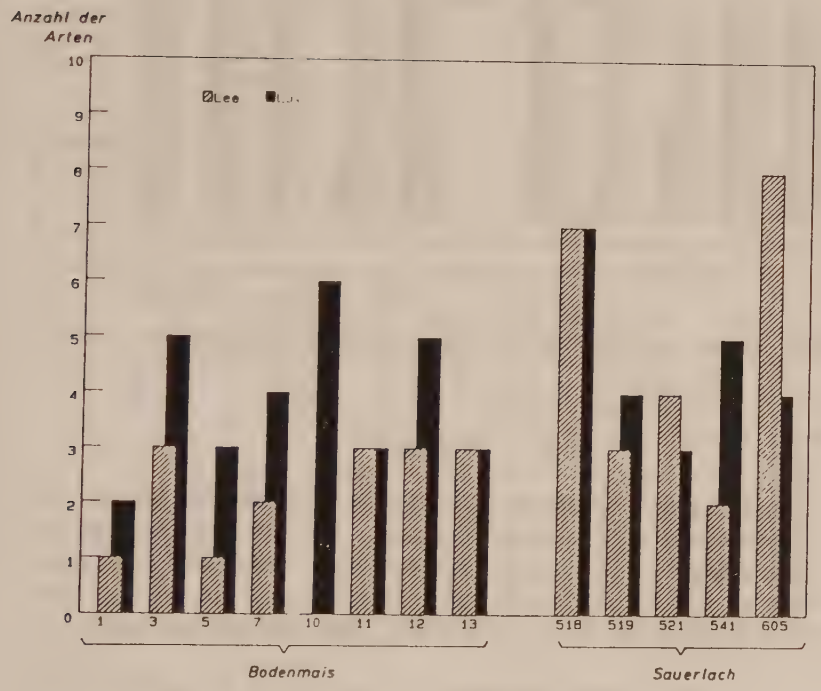


Abb.38: Anzahl der Arten auf Luv- und Leeseite der Kammfichten.

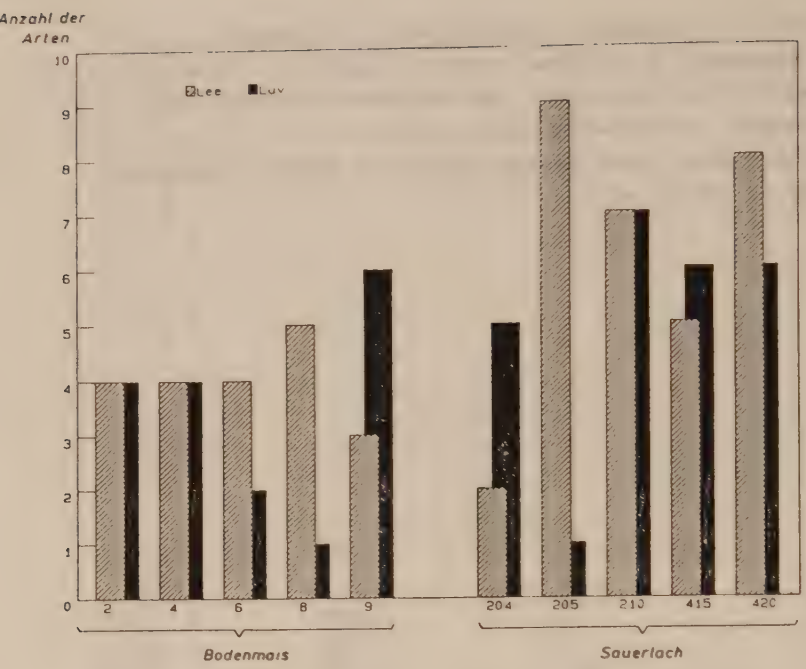


Abb.39: Anzahl der Arten auf Luv- und Leeseite der Plattenfichten.

	Platte	Kamm
Bodenmais	0,5930	0,0277*
Sauerlach	0,7150	0,8551
beide Standorte	0,4990	0,0926

Tab.12: Vergleich von lee- und luvseitiger Artenzahl mit dem U-Test (P-Werte).

Für den Vergleich der Artenspektren beider Standorte bzw. der Einzelbäume wurden von allen Bäumen aus Bodenmais und Sauerlach paarweise S_{AB}-Werte* berechnet. Die in Tabelle 13 angegebenen Werte setzen sich aus den S_{AB}-Mittelwerten der verglichenen Bäume zusammen. In der

* S_{AB}-Wert: vgl. Abschnitt 2.1.5

Spalte "beide Standorte" wurden nur Bäume verschiedener Standorte verglichen.

Der S_{AB}-Wert von 0,17 für die Standorte (Tab.13) unterstreicht den Befund von Abschnitt 2.2.4, daß geographisch getrennte Standorte ein deutlich unterschiedliches Artenspektrum aufweisen. Alle Bäume innerhalb eines Standortes besitzen im Mittel mehr Gemeinsamkeiten im Artenspektrum (höhere S_{AB}-Werte) als Bäume von zwei verschiedenen Standorten.

	Bodenmais	Sauerlach	beide Standorte
P - P	0,29	0,34	0,18
K - K	0,36	0,46	0,15
P - K	0,41	0,27	0,17
alle Bäume	0,39	0,32	0,17
P - II	0,31	0,26	
K - II	0,32	0,33	

Tab.13: S_{AB}-Werte von paarweise verglichenen Platten- und Kammfichten (arithm. Mittel)
P - P = Vergleich von Platten- mit Plattenfichten
K - K = Vergleich von Kamm- mit Kammfichten
P - K = Vergleich von Platten- mit Kammfichten
P - II = Vergleich von Luv und Lee bei Plattenfichten
K - II = Vergleich von Luv und Lee bei Kammfichten

Die Zahl der gemeinsamen Arten auf Luv- und Leeseite ist in Bodenmais bei beiden Verzweigungstypen gleich (Tab.13; P-II, K-II). In Sauerlach weisen die Plattenfichten auf Luv- und Leeseite weniger gemeinsame Arten auf als der Kammtyp, dieser Unterschied konnte jedoch mit dem H-Test nicht abgesichert werden (Tab. 14, PK-II).

Um herauszufinden, ob die Zahl der gemeinsamen Arten typabhängig ist, wurden auch die S_{AB}-Werte der Platten- (PP) bzw. Kammfichtenpaare (KK) und die Platten-/Kammfichtenpaare (PK) dem H-Test unterzogen. Aus den errechneten P-Werten (Tab.14) wird ersichtlich, daß nur die Kammfichtenpaare (KK) in Sauerlach signifikant mehr gemeinsame Arten besitzen als die Platten/Kammfichtenpaare (PK). In Bodenmais ist kein typbezogener Unterschied in der Zahl der gemeinsamen Arten nachweisbar.

	Bodenmais	Sauerlach
PP - KK	0,4360	0,2730
PP - PK	0,4620	0,0676
KK - PK	0,2365	0,0286*
PK -ll	0,7144	0,3427

Tab.14: Vergleich der S_{AB}-Mittelwerte; Ergebnisse des H-Tests (P-Werte).
PP - KK = Vergleich von Platten- mit Kammfichtenpaaren
PP - PK = Vergleich von Platten- mit Platten-/Kammfichtenpaaren
KK - PK = Vergleich von Kamm- mit Platten/Kammfichtenpaaren
PK - ll = Vergleich der Zahl gemeinsamer Arten auf Luv und Leeseite bei Platten- und Kammfichten

3. Wirkung von Pollutantien auf endophytische Pilze in vitro

Die mögliche Einwirkung von Pollutantien auf den Pilzbefall von Koniferen, wird in der Literatur beschrieben (GRZYWACZ & WAZNY 1973, KOWALSKI 1983, KOWALSKI & LANG 1984, SCHMITT 1985, BUTIN 1986, DOMANSKI & KOWALSKI 1987, SCHOTT et al. 1987). Weitgehend unbekannt ist aber, ob eine Veränderung der Wirt-Parasit-Beziehung durch eine Schwächung des Wirtes verursacht wird oder ob Pollutantien die Aggressivität parasitischer Pilze beeinflussen.
Um herauszufinden, ob Ozon (O_3) und Schwefeldioxid (SO_2) Wachstum und Morphologie endophytischer Pilze verändern, wurden entsprechende Kulturen bei Schadgaskonzentrationen inkubiert, die auch im Freien auftreten können.
Der Verdacht, technische Mikrowellen könnten im Zusammenhang mit dem Waldsterben eine Rolle spielen (HOMMEL 1985, SCHULTE-OBBING 1986), war der Anlaß, Pilzkulturen auch elektrischen Feldern und Mikrowellen auszusetzen.

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Schwefeldioxid und Ozon

Für die Begasungsexperimente mit O_3 und SO_2 stellte die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH in München-Neuherberg (GSF) spezielle Expositionskammern zur Verfügung, die es erlaubten, bestimmte Umweltbedingungen (Beleuchtung, Luftfeuchtigkeit, Begasungsvarianten) kontrolliert und reproduzierbar einzustellen. Die aus Plexiglas angefertigten kleinen Expositionskammern besitzen ein Volumen von ca. 1,5 m^3 und sind als Vierergruppe in einer begehbaren Großkammer zusammengestellt. Die technische Beschreibung der Expositionskammern ist bei WALTER & PAYER (1985) publiziert.

3.1.1.1 Behandlungsvarianten

Der Einfluß von Ozon und Schwefeldioxid wurde bei folgenden Behandlungsvarianten untersucht:

1. 500 µg O_3 0^h - 24^h
2. 300 µg SO_2 0^h - 24^h
3. 40 µg O_3 9^h - 18^h + 150 µg SO_2 12^h - 15^h

Bei den Varianten 1 und 2 herrschten konstant 20°C, Licht (150 - 200 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) und eine relative Luftfeuchte von 95% (ohne Nebel).
Bei der kombinierten Begasung (Variante 3) wurde wegen anderer, nicht zu diesem Versuch gehörender Objekte, folgender Tag-Nacht-Rhythmus geschaltet:

Tag:	6^h - 18^h	15°C	85% rel. Feuchte
Nacht:	18^h - 6^h	8°C	95% rel. Feuchte

Die Beleuchtungsstärke betrug etwa 150 - 200 $\mu E m^{-2} s^{-1}$.

Als Kontrolle enthielt jede Großkammer eine unbegaste Kleinkammer mit den gleichen Klimaeinstellungen wie die begasten Kammern.
Die Expositionsdauer betrug bei den Begasungsvarianten 1 und 2 acht Tage, Variante 3 dauerte 14 Tage.

3.1.1.2 Untersuchungsmaterial

Die für die Begasungsexperimente verwendeten Pilzkulturen wurden nach der unter Abschnitt 2.1.3 beschriebenen Methode aus Fichtennadeln isoliert. Sie wurden als Einzelkultur auf Malzagar (2% Malz) angezogen. Um den Kontakt der Schadgase in der von der Kammer vorgegebenen Konzentration mit der Pilzkultur zu ermöglichen, die Kultur aber vor schnellem Austrocknen und Kontamination von außen zu schützen, wurde der Deckel der Petrischale schräg aufgelegt, sodaß ein ca. 1cm breiter Spalt offenstand. In den Kammern wurden die Schalen an dafür angefertigten vertikalen Holzhalterungen befestigt.
Bei allen Begasungsvarianten und den Kontrollen wurden je vier Kuturen pro Pilzart exponiert. Nach der Begasung wurde die Zuwachsrate gemessen und auf ein verändertes makroskopisches Kulturbild (Farbe, Sporenbildung) geachtet.

3.1.2 Elektrische Felder und Radiowellen

Der Einfluß von elektrischen Feldern und Radiowellen auf Pilzkulturen wurde an der Hochschule der Bundeswehr in München-Neubiberg untersucht. Der Versuchsaufbau (Abb.40) ermöglichte die gleichzeitige Durchführung beider Versuche in einem Raum, da die einzelnen Bereiche (UKW-Bereich, Hochspannungsfeld und Kontrolle) mit Faraday'schen Käfigen voneinander abgeschirmt waren.

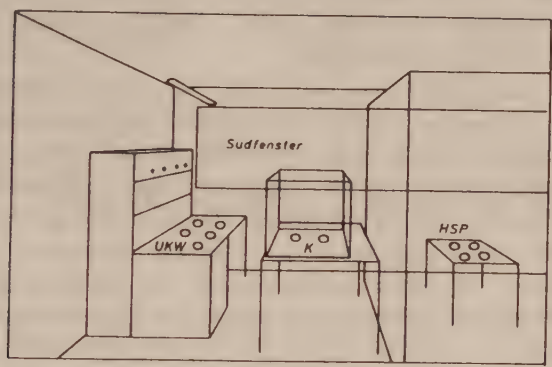


Abb.40: Versuchsaufbau mit UKW-Bereich (UKW), Hochspannungsfeld (HSP) und Faraday-Käfig mit der Kontrolle (K). nach KRUG 1988

Die Ultrakurzwellen erzeugte ein tragbarer Sender, die Abstrahlung erfolgte mit einer Dipolantenne, die ca. 1,2m von der Tischplatte mit den Pilzkulturen entfernt war. Das durch einen großen Faraday-Käfig vom übrigen Raum abgetrennte Hochspannungsfeld wurde mit zwei parallel angeordneten, großen Metallplatten aufgebaut.

Die Pilzkulturen waren folgenden Behandlungen ausgesetzt:

1. Radiowellen UKW 98,5 MHz; 0,2Vm^{-1}, 0,4Vm^{-1}, 0,6Vm^{-1};
2. Hochspannungsfeld 50 Hz; 2KVm^{-1}, 4KVm^{-1};

Jede neue Versuchsreihe war mit einer Erhöhung der Feldstärke verbunden, die Frequenzen blieben unverändert. Die Inkubation dauerte jeweils 14 Tage, bei jeder Neueinstellung der Feldstärken wurden je vier neue Kulturen verwendet.

Nach Beendigung der Inkubation wurde der Zuwachs der Pilzkulturen gemessen und auf Veränderungen des Kulturbildes geachtet.

3.2 Ergebnisse

Die Begasungen mit O_3 und SO_2 wirkten sich auf die Wachstumsgeschwindigkeit fast aller untersuchten Pilzkulturen nur geringfügig aus (Tab.15). *Sirococcus myrtilli* erfährt als einzige Art bei O_3 eine Steigerung der Zuwachsrate gegenüber der Kontrolle um 20%, alle anderen Arten werden schwach gehemmt. Die stärkste Hemmung (24%) ist bei *Trichothecium roseum* zu beobachten.

SO_2 verursacht bei der Hälfte der Arten eine schwache Förderung des Wachstums, die aber nur bei *Phomopsis conorum*, *Rhizosphaera kalkhoffii* und *Sirococcus strobilinus* etwa 10% beträgt. Die übrigen Arten sind nicht von der Kontrolle zu unterscheiden.

Die Kombination beider Schadgase wirkt sich auf die Wachstumsgeschwindigkeit der untersuchten Isolate noch weniger aus als die einzelnen Gase. Nur *S. myrtilli* und *S. strobilinus* werden schwach gefördert.

Das Kulturbild der behandelten Isolate zeigte fast keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle. Nur bei *Sirococcus strobilinus* konnte in der Kombination O_3/SO_2 eine größere Anzahl von Pycnidien festgestellt werden. Die Luftmycellen von *Epicoccum purpurascens* und *Phomopsis conorum* waren in der Kontrolle etwas dichter als in der SO_2 und O_3/SO_2 - Begasung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Ozon und Schwefeldioxid in den gegebenen Konzentrationen auf die untersuchten Pilzkulturen nur einen geringen bis keinen Einfluß haben. Eine statistische Absicherung der Unterschiede ist nicht möglich.

Pilzisolat	O_3	SO_2	O_3/SO_2
Aureobasidium pullulans	92,1	82,7	93,3
Epicoccum purpurascens	97,7	106,1	97,7
Lophodermium piceae	90,6	96,9	83,3
Phomopsis conorum	84,4	110,8	97,5
Rhizosphaera kalkhoffii	90,2	109,8	87,3
Sclerophoma pithyophila	92,0	96,0	102,0
Sirococcus myrtilli	121,7	104,3	112,1
Sirococcus strobilinus	83,2	110,6	107,1
Trichothecium roseum	76,1	98,0	97,6

Tab.15: Ergebnisse der Begasungsversuche mit O_3 und SO_2. Die angegebenen Prozentwerte sind auf die Kontrolle (=100%) bezogen.

Die Einwirkung von Radiowellen auf Pilzkulturen hat nur bei zwei Pilzarten eine leichte Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit ausgelöst (Tab.16). *Lophodermium piceae* wurde bei einer Feldstärke von 0,2Vm⁻¹ etwas stärker gefördert als bei 0,4Vm⁻¹. *Rhizosphaera kalkhoffii* zeigte nur bei 0,2Vm⁻¹ eine leicht erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit. Eine Veränderung des Kulturbildes war bei keinem Isolat erkennbar.

Pilzisolat	0,2Vm⁻¹	0,4Vm⁻¹	0,6Vm⁻¹
Aureobasidium pullulans	99	103	107
Epicoccum purpurascens	106	100	
Lophodermium piceae	120	115	99
Phomopsis conorum		100	100
Rhizosphaera kalkhoffii	110	96	
Sirococcus strobilinus		96	100

Tab.16: Einfluß von Radiowellen auf das Wachstum von Pilzkulturen. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Kontrolle (=100%).

Im Hochspannungsfeld konnte nur bei *Rhizosphaera kalkhoffii* eine deutliche Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet werden (Tab. 17). 2KVm⁻¹ lösten eine leichte Förderung aus, während bei 4KVm⁻¹ eine schwache Hemmung auf 89% (ggü. der Kontrolle) festzustellen war.

Pilzisolat	2KVm⁻¹	4KVm⁻¹
Aureobasidium pullulans	101	100
Epicoccum purpurascens	100	100
Lophodermium piceae	102	100
Phomopsis conorum	100	100
Rhizosphaera kalkhoffii	109	89
Sirococcus strobilinus	102	100
Trichothecium roseum		100

Tab.17: Einfluß von elektrischen Feldern auf das Wachstum von Pilzkulturen. Prozentwerte sind auf die Kontrolle (=100%) bezogen.

In den Ergebnissen dieser Untersuchungen waren keine statistisch absicherbaren Unterschiede nachzuweisen.

4. Untersuchungen zur Variabilität von Lophodermium piceae

Die an den Standorten Arber und Deisenhofen gewonnenen Isolate von *Lophodermium piceae* (Fuck.)Höhn. variierten stark im Kulturverhalten – eine Beobachtung, die auch von RACK & BUTIN (1984) beschrieben wird. Um festzustellen, ob regelmäßige oder gar systematische Zusammenhänge in den beobachteten Variationen bestehen und möglicherweise auch eine Korrelation mit der Herkunft der Isolate erkennbar wird, wurden Kulturmerkmale beschrieben und gruppiert. Außerdem wurde die Fähigkeit der Isolate überprüft, verschiedene Kohlehydratquellen zu verarbeiten. Tests der enzymatischen Aktivitäten ergänzen die Beschreibung der phänotypischen Merkmale.
Schließlich soll die elektrophoretische Auftrennung von Isoenzymen des Pilzes zeigen, wie stark *L. piceae* genetisch variiert, und ob sich phänotypische Unterschiede der Kulturen im Isoenzymmuster wiederspiegeln.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Herkunft des Pilzmaterials

Die für die Untersuchungen verwendeten Kulturen von *L. piceae* stammen ausschließlich aus den Probenahmen des Jahres 1986. Für Vergleiche des makroskopischen Kulturbildes wurden 82 Isolate (72 vom Standort Arber, 10 aus Deisenhofen) herangezogen. Von den vier beschriebenen "Kulturtypen" (vergl. Abschnitt 4.2.1) wurden je 10 (von "Typ 2" nur 6) Isolate mikroskopisch untersucht. Subkulturen der mikroskopisch untersuchten Isolate wurden für die weiteren Tests (Enzymaktivitäten, Substratverwertung, Elektrophorese) verwendet. Die Herkunft der Isolate und die im weiteren verwendeten Kulturnummern sind in Tab.18 zusammengestellt:

Kultur-Nr.	Herkunft des Isolates Mon.	Sto.	Bnr.	Jg.	Kultur-Nr.	Herkunft des Isolates Mon.	Sto.	Bnr.	Jg.
1.1	7	1	1	6	3.3	7	1	3	6
1.2	9	1	1	2	3.4	10	1	1	3
1.3	9	1	1	2	3.5	10	1	1	4
1.4	10	1	1	3	3.6	10	1	1	4
1.5	10	1	2	5	3.7	11	1	1	3
1.6	11	1	1	4	3.8	11	1	1	4
1.7	11	1	1	5	3.9	11	1	1	5
1.8	12	1	1	7	3.10	12	1	2	3
1.9	6	2	5	4	4.1	7	1	1	2
1.10	10	2	4	6	4.2	7	1	1	2
2.1	7	1	1	7	4.3	7	1	1	5
2.2	7	1	2	2	4.4	7	1	3	6
2.3	7	1	3	7	4.5	7	1	3	6
2.4	10	1	1	5	4.6	7	1	3	6
2.5	12	1	2	3	4.7	8	1	1	4
2.6	8	2	6	4	4.8	9	1	1	4
3.1	7	1	1	6	4.9	11	1	1	4
3.2	7	1	3	1	4.10	10	2	6	6

Tab.18: Herkunft der L. piceae Isolate. Die Kulturnummer gibt vor dem Punkt den makroskopisch bestimmten Kulturtyp an. Mon.=Monat der Isolation, Sto.=Standort (1:Arber, 2:Deisenhofen), Bnr. =Baumnummer, Jg.=Nadeljahrgang.

4.1.2 Kulturmerkmale

Die Beschreibungen der makroskopischen Kulturmerkmale erstrecken sich auf das Aussehen der Kultur (Farbe, Dichte des Luftmycels, Ausbildung von Rändern, Lage der Pycnidien in der Kultur), die Wachstumsgeschwindigkeit und das Verhalten in Dualkulturen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde bei vier Temperaturen beobachtet (4°, 12°, 21°, 27°C). Meßgröße waren zwei im rechten Winkel zueinander liegende Durchmesser der Kultur, die zu einem Mittelwert zusammengefaßt wurden. Für den Vergleich der Zuwachsraten wurde die Größe des Inokulums auf Null standardisiert. Die Kulturen für die Zuwachsmessungen wurden bei Dunkelheit inkubiert.

Die für die Untersuchung des Wachstums in Dualkulturen verwendeten Inokula wurden in einem Abstand von ca. 2 cm in eine Petrischale (ø 8,5 cm) gelegt und bei Raumtemperatur (ca. 21°C) und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus inkubiert. Miteinander kombiniert wurden alle Kulturtypen und Isolate des gleichen Kulturtyps. Die Auswertung erfolgte, nachdem die Ränder der beiden Kulturen dicht zueinander gewachsen waren. Das geschah nach etwa vier bis fünf Tagen.

Bei der Beschreibung der mikroskopischen Merkmale wurde die Größe der Sporen, der Pyknidien und die Dicke der Hyphen gemessen. Ebenso wurden makroskopisch auffallende Stellen (z.B. braune Flecken des Luftmycels) untersucht.

Für die Stammhaltung von *L. piceae* und die Anzucht von Vergleichskulturen der "Kulturtypen" fand 2%iger Malzagar als Nährboden Verwendung.

4.1.2 Verwertung von Kohlehydraten

Bei Pilzen kann in einem Kohlehydratüberangebot des Mediums ein Anstau von Stoffwechselintermediärprodukten entstehen. Diese Intermediärprodukte werden direkt oder leicht verändert ausgeschieden (FOSTER 1949). Die Fähigkeit, bei der Umsetzung von Zuckern im Citratcyclus gebildete Säuren auszuscheiden, wurde bei den mit *L. piceae* durchgeführten Zucker-Tests genützt:
Den nachstehend beschriebenen Zuckermedien wurde als pH-Indikator Phenolrot zugegeben, der durch Farbumschlag nach gelb im pH-Bereich 6,4 - 8,2 eine pH-Abnahme und damit indirekt den Abbau des Zuckers im Medium nachweist.
Um bei positiven Testergebnissen die Diffusion der ausgeschiedenen Säuren zu erleichtern und die gelbe Zone um die Kulturen im sonst roten Nährboden zu vergrößern, enthielten die Zuckermedien nur 1,5% Agar (alle anderen Medien 2%).
Die Zucker wurden in aqua dest. gelöst, mit Sartorius - Minisat NML Filtern (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert und dem Medium nach dem Autoklavieren zugegeben.

Zusammensetzung der Zuckermedien (nach OUELLETTE 1972)

$FeCl_3$	0,01 g
KCl	0,25 g
KH_2PO_4	0,50 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,50 g
Asparagin	2,00 g
Zucker*	20,00 g
Phenolrot	0,08 g
Agar	15,00 g
aqua dest.	1000,00 ml

* Die einzelnen Ansätze enthalten jeweils folgende Zucker:
Adonit (AD), Arabinose (AR), Glucose (D), Dulcit (DU), Galactose (GA), Inosit (I), Lactose (L), Lävulose (LE), Maltose (M), Mannose (MA), Mannit (MN), Rhamnose (R), Raffinose (RA), Salicin (SA), Sorbit (SO), Saccharose (SU), Trehalose (TR), Xylose (X).

Die Zuckermedien wurden mit einem ca. 0,25 cm^2 großen Inokulum beimpft und bei 20°C im Brutschrank inkubiert. Die Bebrütung mußte in Dunkelheit erfolgen, da – wie sich in Voruntersuchungen zeigte – bei Lichteinwirkung auch ohne Pilz eine gelbliche Verfärbung der Nährböden auftreten konnte. Bei Erscheinen eines gelben Hofes um die Kultur, spätestens aber bei Erreichen eines Kulturdurchmessers von etwa 3 cm wurde der Zuckertest ausgewertet. Alle Tests wurden mit dreifachem Ansatz durchgeführt. Als Kontrolle diente das oben beschriebene Medium, jedoch ohne Zusatz von Zucker.

4.1.4 Nachweis von Enzymaktivitäten

Für die Untersuchung enzymatischer Aktivitäten dienten zum einen Nährmedien mit speziellen Zusammensetzungen und zum anderen das API ZYM Testkit*. Alle Isolate wurden mit beiden Methoden untersucht. Das API ZYM – System, eine semiquantitative Methode zum Nachweis von 19 Aktivitäten, erlaubte zusätzlich eine Unterscheidung von extra- und intrazelluläre Enzymaktivitäten.

---

*API SYSTEM S.A. – La Balme les Grottes 38390 – Montalieu Vercieu (France)

Als Anzuchtmedium für die Tests auf festen Nährböden diente 2%iger Malzagar. Kulturen für die Untersuchung mit API ZYM wurden in flüssigen Medien (2% Malz in aqua dest.) angezogen. Diese Flüssigkulturen (jeweils 50 ml im Erlenmeyerkolben) wurden vier Wochen bei 20°C auf einem Kulturschüttler inkubiert.

4.1.4.1 Enzymatische Aktivitäten auf festen Nährböden

Mit insgesamt 9 verschiedenen Nährböden wurden die Aktivitäten von Amylase, Caseinase, Cellulase, DNAse, Lipase, Phenoloxidasen, Protease, RNAse und der Citratabbau getestet. Die Auswertung der Tests erfolgte nach positiver Reaktion, spätestens jedoch nach 6 Wochen. War für die Sichtbarmachung von Enzymaktivitäten die Überschichtung mit Reagenzien notwendig, wurden die Kulturen so lange inkubiert, bis sie einen Durchmesser von ca. 3 cm hatten, um bei positiven Ergebnissen eine ausreichend starke Farbreaktion zu gewährleisten.
Alle Untersuchungen wurden mit dreifachem Ansatz bei 20°C und Dunkelheit durchgeführt.

Zusammensetzung der Nährböden und Nachweisreaktionen:

Amylase (DONLY & DAY 1984)

lösliche Stärke	20 g
Agar	20 g
aqua dest.	1000 ml

Die Kultur wurde nach der Inkubation mit Lugols Lösung (Iod-/Iodkali Lsg.) überschichtet. Bei positiven Nachweis wird wegen der abgebauten Stärke um die Kultur ein ungefärbter Hof sichtbar.

Caseinase (nach DONLY & DAY 1984)

Magermilchpulver	100g
Agar	20g
Aqua dest.	1000ml

Ein klarer Hof im sonst trüben Medium zeigt Caseinase-Aktivität an

Cellulase (nach CARROL & PETRINI 1983)

$CaCl_2$	0,13 g
KCl	0,50 g
KH_2PO_4	1,00 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,54 g
Spurenelementlsg.	1,00 ml
Vitaminlösung	3,00 ml
Cellulose	20,00 g
Agar	20,00 g
aqua dest.	996,00 ml

Spurenelementlösung

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	100 mg
Eisencitrat	500 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	500 mg
$Na_2B_4O_7$	10 mg
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	50 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	440 mg
aqua dest.	100 ml

Vitaminlösung

Folsäure	1 mg
Inosit	100 mg
Nicotinsäure	10 mg
Thiamin	1 mg
aqua dest.	100 ml

Die Vitaminlösung wurde mit Sartorius - Minisat NML Filtern (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert und dem Medium nach dem Autoklavieren zugegeben. Der Nachweis ist positiv, wenn das Medium um die Kultur aufklart.

DNAse (HANKIN & ANAGNOSTAKIS 1975)

NaCl	5 g
Trypton	20 g
DNA	2 g
Agar	15 g

Wird die Kultur nach der Inkubation mit 1N HCl überschichtet, entsteht bei positivem Nachweis um die Kultur eine klare Zone im sonst dunklen Medium.

RNAse (HANKIN & ANAGNOSTAKIS 1976)

Das Medium setzt sich wie bei der DNAse zusammen; statt DNA wird jedoch RNA verwendet. Der Nachweis der Aktivität ist ebenfalls mit dem für DNAse identisch.

Lipase (HANKIN & ANAGNOSTAKIS 1975)

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 g
NaCl	5,0 g
Difco Pepton	10,0 g
Tween 20	10,0 ml
Agar	20,0 g
aqua dest.	990,0 ml

Tween 20 wurde separat ca. 15 min autoklaviert.
Der Nachweis ist positiv, wenn ein sichtbarer Niederschlag (Ca-Salz-Kristalle) oder eine klare Zone um die Kultur entsteht.

Phenoloxidasen (SIEPMANN & ZYCHA 1968)

Malz	30 g	
Tannin	5 g	(oder Gallussäure)
Agar	20 g	
aqua dest.	1000 ml	

Es wurden getrennte Ansätze für Tannin und Gallussäure gemacht. Der Nachweis war positiv, wenn um die Kultur eine braune Zone entstand.

Protease (JIMÉNEZ et al. 1986)

NaCl	5 g
Pepton	10 g
Gelatine	200 g
Wasser	1000 ml

pH 6.8

Das Medium wurde in Kulturröhrchen gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 5 Tagen wurden die Röhrchen 2 Stunden auf 0°C abgekühlt. Verflüssigtes Medium zeigt den Abbau von Gelatine an.

Citratabbau

K_2HPO_4	1,00 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20 g
NaCl	5,00 g
$(NH_4)H_2PO_4$	1,00 g
Natriumcitrat	2,00 g
Bromthymolblau	0,08 g
Agar	20,00 g
aqua dest.	1000,00 ml

Der Citratabbau geht mit NaOH-Bildung einher und verursacht damit eine Erhöhung des pH-Wertes im Medium. Ein positiver Nachweis äußert sich daher in einer Blaufärbung um die Kultur im sonst grünen Medium.

4.1.4.2 Der API ZYM - Test

Das API ZYM - System ist eine semiquantitative Mikromethode zur Untersuchung von 19 enzymatischen Aktivitäten. Es besteht aus einem Teststreifen mit 20 Mikroröhrchen, an deren Boden sich Enzymsubstrat und Puffer befinden. Das erste Röhrchen dient der Kontrolle und enthält kein Substrat. Die Substrate in den übrigen Röhrchen, das untersuchte Enzym und die Farbreaktion bei positivem Ergebnis sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Farbreaktionen wurden mit zwei im Kit enthaltenen Reagenzien ausgelöst. Die Reagenzien setzen sich wie folgt zusammen:

<u>Reagenz A</u>

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	205 g
HCl 37%ig	110 ml
Laurylsulfat	100 g
aqua dest.	1000 ml

<u>Reagenz B</u>

Fast Blue BB	3,5 g
2-methoxyethanol	1000 ml

Die Farbreaktionen wurden mit einer Referenzfarbskala verglichen und je nach Intensität mit 1 - 5 bewertet werden. 0 bedeutet eine negative, 5 die stärkste Reaktion.

Nº	Untersuchtes Enzym	Substrat	pH	Farbreaktion
1	Kontrolle	ohne	-	keine, oder Farbe der Probe
2	Alkalische Phosphatase	2-Naphtyl-Phosphat	8,5	violett
3	Esterase (C4)	2-Naphtyl-Butyrat	7,1	violett
4	Esterase Lipase (C8)	2-Naphtyl-Caprylat	-	violett
5	Lipase (C14)	2-Naphtyl-Myristat	-	violett
6	Leucin-Aminopeptidase	L-Leucyl-2-Naphtylamid	7,5	orange
7	Valin-Aminopeptidase	L-Valyl-2-Naphtylamid	-	orange
8	Cystin-Aminopeptidase	L-Cystyl-2-Naphtylamid	-	orange
9	Trypsin	N-Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid	8,5	orange
10	Chymotrypsin	N-Benzoyl-DL-Phenyl-Alanin-2-Naphtylamid	7,1	orange
11	Saure Phosphatase	2-Naphtyl-phosphat	5,4	violett
12	Phosphoamidase	Naphtol-AS-BI-Phosphodiamid	-	blau
13	α-Galactosidase	6-Br-2-Naphtyl-αD-Galactopyranosid	-	violett
14	β-Galactosidase	2-Naphtyl-βD-Galactopyranosid	-	violett
15	β-Glucuronidase	Naphtol-AS-BI-βD-Glucuronat	-	blau
16	α-Glucosidase	2-Naphtyl-αD-Glucopyranosid	-	violett
17	β-Glucosidase	6-Br-2-Naphtyl-βD-Glucopyranosid	-	violett
18	β-Glucosaminidase	1-Naphtyl-N-Acetyl-βD-Glucosaminid	-	braun
19	α-Mannosidase	6-Br-2-Naphtyl-αD-Mannopyranosid	-	violett
20	α-Fucosidase	2-Naphtyl-αL-Fucopyranosid	-	violett

Tab.19: Belegung der 20 Mikroröhrchen des API ZYM - Teststreifens.

Die Präparation des Probematerials und die Durchführung des Tests verlief folgendermaßen:
Die im Wasserstrahlvakuum abfiltrierten und zweimal mit aqua dest. nachgewaschenen Mycellen der Flüssigkulturen wurden mit einem Glasstab in flüssigem Stickstoff pulverisiert. 5 mg des Pulvers wurden in 1ml aqua dest. suspendiert und von der Suspension mit einer Pasteurpipette je zwei Tropfen in jedes Mikroröhrchen des Teststreifens gegeben. Zur Untersuchung der extrazellulären Enzyme wurden je zwei Tropfen des Mediums in die Röhrchen gegeben. Als Kontrolle für die extrazellulären Enzyme diente unbeimpftes, steriles Medium.

Die Inkubation des beimpften Teststreifens erfolgte in einer dafür angefertigten feuchten Kammer 6 Stunden in Dunkelheit bei 37°C.

Nach der Inkubation wurden in jedes Mikroröhrchen je 1 Tropfen Reagenz A und je 1 Tropfen Reagenz B gegeben. Nach etwa 5 min haben sich die Farben entwickelt. Anschließend mußte der Teststreifen unter eine starke Lichtquelle gelegt werden, um überschüssige Reagenzien zu vernichten und die negativen Reaktionen farblos erscheinen zu lassen. Nach dem Ablesen der Reaktionen wurden die Teststreifen verworfen, da die Farben nur einige Stunden beständig sind.

4.1.5 Elektrophorese

Die Auftrennung der Isoenzyme erfolgte in Anlehnung an MICALES et al. (1986) mit Stärkegelelektrophorese. Für die Untersuchungen wurden vier Enzymsysteme* ausgewählt, die genügend Aktivität für eine Analyse aufweisen. Im einzelnen sind dies:

Enzym	E.C.Nr.	Funktion
Alkoholdehydrogenase (ADH)	1.1.1.1	Glycolyse
Lactatdehydrogenase (LDH)	1.1.1.27	Glycolyse
Saure Phosphatase (ACP)	3.1.3.2	Hydrolyse von Phosphaten
Alkalische Phosphatase (AKP)	3.1.3.1	Hydrolyse von Phosphaten

*Als Enzymsystem wird die Summe aller Isoenzyme mit gleicher Substratspezifität bezeichnet.

4.1.5.1 Zusammensetzung der Puffer

Extraktionspuffer:
0,05 M Tris-HCl; pH = 7,1

Gelstammlösung: (RIDGWAY et al. 1970)
0,03 M Tris
0,005 M Citrat
pH 8,5

Elektrodenpuffer: (RIDGWAY et al. 1970)
0,06 M LiOH
0,30 M Borsäure
pH 8,1

Gelpuffer: (RIDGWAY et al. 1970)
99% Gelstammlösung
1% Elektrodenpuffer

Tris bez. LiOH wurde in der oben angegebenen Konzentration in 1000 ml aqua dest. gelöst, von der Säure (Citrat bez. Borsäure) wurde unter Rühren soviel zugegeben, bis sich der vorgeschriebene pH-Wert eingestellt hat.

4.1.5.2 Herstellung des Stärkegels

Gießform:
Die Gießform besteht aus einer 27 x 27cm großen Plexiglasplatte, die an drei Seiten einen 1cm hohen Rand besitzt. Auf diese Platte wurden zwei durch einen schmalen Plexiglasstreifen voneinander getrennte Glasplatten (27 x 12 0,3cm) gelegt. Die offene (vierte) Seite wurde von einem weiteren Plexiglasstreifen abgeschlossen (Abb.41).
Die Glasplatten wurden, um ein Versteifen der Stärkelösung während des Gießens zu verhindern, im Trockenschrank auf 60°C erhitzt.

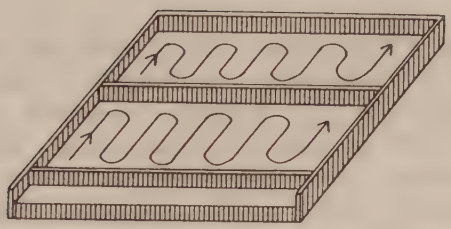


Abb.41: Gießform und Gießschema.

Zusammensetzung des Gels:

Stärke	55,00 g
Saccharose	11,14 g
Gelpuffer	500,00 ml

Herstellung der Stärkelösung und Gießen des Gels:

In einer 1000 ml - Saugflasche wurde Stärke unter Vermeidung von Klumpenbildung in 1/3 des Gelpuffers gegeben. Der Rest des Puffers wurde im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach etwa 5 min wurde der heiße Puffer in das Stärke-Puffer-Gemisch gegossen. Unter ständigem Rühren wurde dieses Gemisch solange erhitzt, bis sich durch Aufklaren der zuvor trüben Flüssigkeit das Lösen der Stärke anzeigte. Die gelöste Stärke wurde anschließend im Wasserstrahlvakuum entgast, bis sich keine großen Luftblasen mehr bildeten (nach ca. 10 sec.).

Von der heißen Stärkelösung wurden auf jede Glasplatte 250ml zügig nach dem in Abb.41 gezeigten Schema gegossen. Die Gele wurden im Kühlschrank abgekühlt, so daß sie nach etwa einer Stunde genügend erstarrt waren. Kurz vor dem Auftragen der Proben wurden die Gele vorsichtig mit den Glasplatten aus der Gießform gelöst und mit einem Skalpell ein senkrechter, das ganze Gel durchdringender Längsschnitt gezogen, der einen 3cm breiten Streifen abtrennte. Dieser schmale Streifen wurde vorsichtig etwa 0,5cm vom Rest des Gels weggeschoben.

4.1.5.3 Vorbereiten und Auftragen der Proben

Als Untersuchungsmaterial dienten Kulturen von *L. piceae*, die 5 Wochen auf Malzagar (2% Malz) bei Raumtemperatur und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus bebrütet worden waren. Alle im selben Trennungslauf verglichenen Kulturen waren gleich alt. Das Mycel dieser Kulturen wurde mit einer entfetteten Rasierklinge ohne die Agarschicht zu verletzen vorsichtig abgeschabt. Es wurde darauf geachtet, homogenes Material zu entnehmen, d.h. Mycel ohne Pycnidien und Sporen, da wegen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien in heterogenen Proben die Expression der Allele und damit die Bandenmuster variieren können.

Für die Homogenisation wurden in einen Plexiglasblock (21 x 11 x 2,5cm) mit einem Kugelbohrer mehrere Vertiefungen (ø 1,5cm; Tiefe 0,5cm) gebohrt. Die abgeschabten Mycelien wurden in diese kleinen Reibmulden gegeben und in 10-15µl Extraktionspuffer mit einem Glasstab zerrieben. Die Menge des Puffers wurde so gewählt, daß das Homogenat feucht genug war, um die im Puffer gelösten Enzyme in Filterpapierstreifen aufsaugen zu können, die Verdünnung der Enzyme aber nicht so groß war, daß der Aktivitätsnachweis unmöglich wurde. Die Enzyminaktivierung durch Proteasen im Homogenat wurde mit Zugabe von Polyvinylpyrrolidon verhindert. Der Plexiglasblock mit den Reibmulden wurde im Kühlschrank vorgekühlt, damit die Homogenisation bei möglichst niedriger Temperatur erfolgen konnte.

In die in den Reibmulden belassenen Homogenate wurden je vier Filterpapierstreifen (12 x 2mm, Whatman-Chromatographiepapier Nr.3) gesteckt, um die im Extraktionspuffer gelösten Enzyme aufzusaugen. Diese Streifen wurden nach 10 min vertikal so in den Längsspalt an den größeren Teil des Gels gestellt, daß das Ende, das mit dem Mycel aufgesaugt worden war über die Geloberfläche herausragte. Die acht untersuchten Proben wurden pro Gel zweimal von 1-8, wie in Abb.42 dargestellt, angeordnet. Als Kontrolle für die Wanderungsgeschwindigkeit wurde vor der ersten und nach der letzten Probebahn ein mit Bromphenolblau versehener Filterpapierstreifen gesetzt. Anschließend wurden die beiden Gelteile zusammengeschoben und darauf geachtet, daß ein guter, blasenfreier Kontakt entstand.

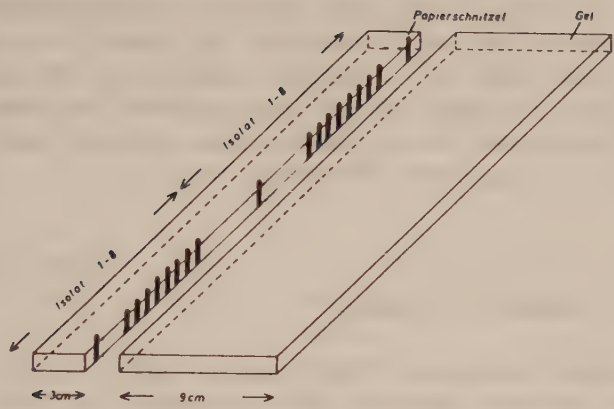


Abb.42: Anordnung der Proben im Gel. (verändert nach AAS 1988)

4.1.5.4 Auftrennung der Isoenzyme

Vorbereitung der Elektrophoresekammern und Laufbedingungen:

In zwei Elektrophoresekammern (Firma "Krannich") wurde je eine mit Ethanol gekühlte Kühlplatte gelegt und in die Pufferkammern je 500ml Elektrodenpuffer gegeben. Die Gele mit den aufgetragenen Proben wurden so auf die Kühlplatten gelegt, daß die größere Gelhälfte auf der kathodischen Seite zu liegen kam. Als Pufferbrücke wurde Saugfaservlies aus 100% Vinyl (Firma "Elite") verwendet. Dieser Vlies wurde mit Puffer getränkt und beiderseits 2,5 cm glatt auf das Gel gelegt. Anschließend wurden die Kammern geschlossen und die Elektroden mit dem Netzgerät (Firma "Krannich") verbunden.

Die Auftrennung der Isoenzyme erfolgte bei 150 V (= ca.20 $V \cdot cm^{-1}$), die Laufzeit betrug etwa 2,5 Stunden. Die Elektrophorese wurde nach einer Laufstrecke der Farbmarkierung von etwa 5 cm beendet.

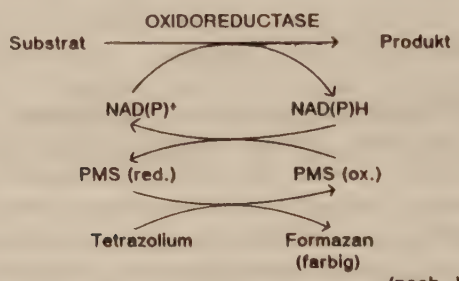
Schneiden der Gele:

Die Gele wurden aus den Kammern genommen und die Filterpapierstreifen entfernt. Mit einem in der Höhe regulierbaren, horizontal über eine Plexiglasplatte gespannten Draht wurden die Gele in drei Schichten ge-

schnitten. Die oberste Schicht wurde verworfen, da wegen der Oberflächenbeschaffenheit des Gels die Auftrennung nicht optimal ist. Die mittlere und untere Schicht (je ca. 2mm dick) wurden in der Mitte auseinandergeschnitten, so daß pro Gel vier Stücke entstanden, die jeweils die acht zu untersuchenden Proben enthielten. Diese Gelstücke wurden zur Anfärbung in die vorgesehenen Färbelösungen gelegt.

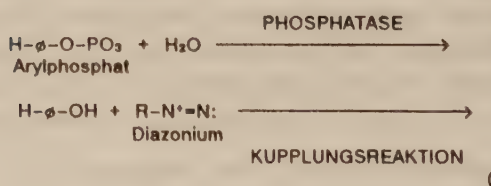
4.1.5.5 Anfärbung der Isoenzyme

Dem allgemeinen Sprachgebrauch folgend, wird im Weiteren von der "Anfärbung der Isoenzyme" gesprochen, obwohl die Enzyme selbst nicht gefärbt werden. Die Farbreaktion bei Oxidoreductasen (ADH und LDH) beruht auf einer Reduktion des farblosen Tetrazolium-Salzes zu farbigen Formazan, der letzten Stufe einer kleinen Reaktionskette:



(nach VALLEJOS 1983)

Bei den Hydrolasen (ACP und AKP) liegt eine Kupplungsreaktion des Diazoniumsalzes zugrunde*:



(nach VALLEJOS 1983)

---

* -ø- = aromatischer Ring
R- = organischer Rest

Färbelösungen für die Enzymfärbung: (MICALES et al. 1986)

Alkoholdehydrogenase:

MTT	10 mg
PMS	3 mg
NAD	15 mg
Ethanol	3 ml
Gelpuffer	100 ml
pH 8,0	

Lactatdehydrogenase:

MTT	10 mg
PMS	3 mg
NAD	15 mg
Lactat 0,5 M	10 ml
Gelpuffer	100 ml
pH 7,5	

Saure Phosphatase:

α-Naphthylphosphat	100 mg
Fast garnet GBC Salz	50 mg
Gelpuffer	100 ml
pH 4,0	

Alkalische Phosphatase:

α-Naphthylphosphat	100 mg
Fast garnet GBC Salz	50 mg
Gelpuffer	100 ml
pH 8,5	

Die Färbelösungen für die Isoenzyme wurden wegen der starken Lichtempfindlichkeit der Tetrazolium- und Diazolium-Salze unter Vermeidung von Lichteinwirkung frisch hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1N HCl bez. Tris. Die Gelstücke wurden in geschlossene Glaspetrischalen mit je 100 ml Färbelösung gelegt und bei Dunkelheit und 37°C im Brutschrank inkubiert. Auswertbare Ergebnisse haben sich nach 3 - 3,5 Stunden entwickelt. Die stärksten Banden der Sauren Phosphatase waren schon nach 40 min zu erkennen.

Auswertung:
Es fand ein Vergleich der Bandenmuster statt, deren Ähnlichkeiten mit Hilfe der Cluster-Analyse (SPSS/PC+ - Programmpaket: "Hierarchical Cluster Analysis", Squared Euclidean measure) berechnet und in Gruppen zusammengefaßt wurde.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Variation der Kulturmerkmale

Merkmale der Kulturtypen
Der makroskopische Vergleich der 82 Isolate von *L. piceae* erlaubte die Aufstellung von vier Gruppen unterschiedlichen Aussehens. Diesen Gruppen (weiterhin "Kulturtypen" genannt) konnten insgesamt 57 Isolate, also fast 70%, zugeteilt werden.

Die 4 Kulturtypen sind nicht scharf voneinander abgrenzbar. Relativ hoch (30%) ist daher auch der Anteil der Isolate, die keinem dieser Kulturtypen zugeordnet werden konnten. Die Merkmale bleiben zwar in der Regel in Subkulturen erhalten, häufig verwischen sie sich aber durch eine typunabhängige Braunverfärbung. Dies tritt häufig bei älteren Kulturen auf. Eine Aufhellung oder Weißverfärbung konnte nicht beobachtet werden. Junge Kulturen sind überwiegend weiß, die "Differenzierung" der Typen ist erst nach 5-7 Wochen erkennbar.

Die Kulturtypen, deren Merkmale in Tab.20 gegenübergestellt sind, lassen sich folgendermaßen unterscheiden:

Kulturtyp 1:
Die Kultur ist auf der Ober und Unterseite rein weiß. Das Luftmycel kann im Zentrum der Kultur unterschiedlich dicht filzig sein und nimmt zum Rand hin an Dichte ab. Das spärliche Luftmycel am Rand der Kultur reicht nicht über das submers im Nährboden wachsende Mycel hinaus, wodurch der Rand der Kultur - vorallem vor dunklem Hintergrund - scharf abgegrenzt wird. Pyknidien werden nach 4-5 Wochen ausgebildet. Sie liegen meist im Zentrum der Kultur dicht um oder auf dem Inokulum.

Kulturtyp 2:
Das Luftmycel dieses Typs ist dichter und "flockiger" als beim Typ 1 und ist auch am Rand der Kultur noch dicht filzig. Der deutlichste Un-

terschied zu Typ 1 ist das Auftreten von braunen' Flecken im Luftmycel, die sich entweder gleichmäßig über die gesamte Kultur verteilen oder zum Zentrum hin dichter werden und dort auch oft zusammenfließen. Die Unterseite der Kultur ist je nach Dichte und Verteilung der Flecken braun gefärbt. Die Pyknidien sind mehr oder weniger gleichmäßig über die ganze Kultur verteilt und treten nach 4-5 Wochen auf.

Kulturtyp 3:

Ein wesentliches Erkennungsmerkmal diese Typs ist die überwiegend bräunlich bis schmutzig-weißlich oder schwachgraue Färbung des Luftmycels. Es ist bis zum Rand hin dünn und feinfilzig, dort aber sehr spärlich. Nicht selten bilden sich Sektoren mit etwas dichterem, Luftmycel aus, das Ähnlichkeit mit dem des Kulturtyps 2 aufweisen kann. Sehr feines weißes Luft- und Substratmycel reicht über den braunen Bereich hinaus und bildet einen diffusen Rand der Kultur. Die Unterseite der Kultur ist im Zentrum dunkelbraun und hellt zu dem auf der Oberseite sichtbaren diffusen Rand hin auf. Die Pyknidien erscheinen nach 4-5 Wochen. Sie sind über die ganze Kultur verteilt, liegen aber häufiger in den dichteren Bereichen des Luftmycels.

Kulturtyp 4:

Das auf der ganzen Kultur gleichmäßig dünne Luftmycel ist weiß und bildet bisweilen im Zentrum braune Flecken aus, die aber deutlich weniger zahlreich sind als bei Typ 2. Die Unterseite ist im Zentrum etwas dunkler gefärbt. Die Pyknidien sind, vom Inokulum ausgehend, spärlich über die ganze Kultur verteilt. Der Rand der Kultur erscheint oft als als eine harte, dünne, scharf abgegrenzte Linie, wenn das Wachstum stagniert. Diese Linie, die bei den anderen Typen nur in Dualkulturen oder bei Kontamination auftritt, ist auch bei eingetrockneten Kulturen noch leicht erhaben. Durch Unregelmäßigkeiten des Wachstums kann es vorkommen, daß kleine Einbuchtungen des Kulturrandes frei von Mycel bleiben und später umwachsen werden. Auch diese Bereiche werden von dem scharfen Rand abgegrenzt, sodaß bei weiterem Wachstum in der Kultur schwarze Ringe entstehen, die im Innern frei von Luftmycel sind.

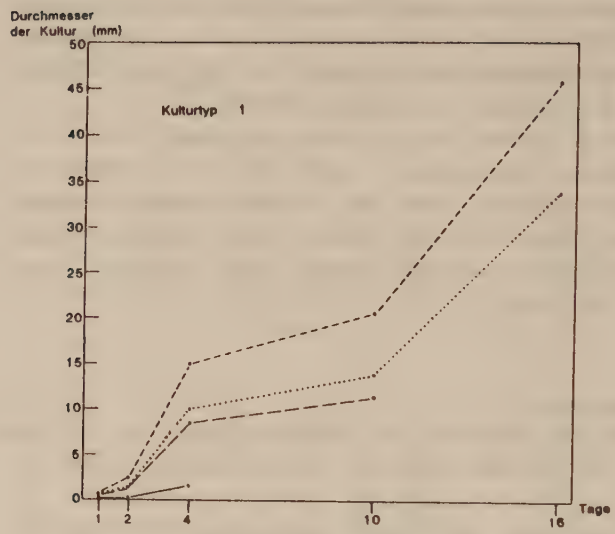
Kulturtyp	EINS	ZWEI	DREI	VIER
Luftmycel (LM) Farbe	weiß	weiß mit braunen Flecken; im Zentrum meist braun	bräunlich bis schwach grau, am Rand heller	weiß, selten im Zentrum braune Flecken (weniger als Typ 2)
Dichte	filzig, am Rand dünner	filzig bis flockig, auch am Rand	sehr feinfilzig	sehr feinfilzig
Sektorenbildung	nein	nein	ja; LM ähnlich Typ 2	nein
Submersmycel (SM) Farbe	farblos	farblos	farblos bis braun	farblos
Rand der Kultur LM/ SM	LM schließt mit SM ab	LM schließt mit SM ab	unregelmäßg, kein gemeinsamer Rand von LM/ SM	LM schließt mit SM ab
Abgrenzung	scharf	scharf	diffus	scharf
braune Ränder in Reinkultur	nein	nein	nein	ja
in Dualkultur	ja	ja	ja	ja
Unterseite der Kultur Farbe	weiß	je nach Zahl der Flecken weiß bis braun	dunkelbraun am Rand heller	weiß, im Zentrum etwas dunkler
Pyknidien Verteilung	meist im Zentrum	über ganze Kultur	über ganze Kultur im Sektor häufiger	über ganze Kultur, im Zentrum häufiger

Tab.20: Merkmale der Kulturtypen von Lophodermium piceae.
LM=Luftmycel SM=Substratmycel

Auch mikroskopisch weist *Lophodermium piceae* eine Variabilität auf, die sich aber gleichmäßig auf alle Isolate erstreckt, ohne daß eine Gruppeneinteilung oder Parallele mit den makroskopischen Kulturtypen erkennbar ist. Die Größe der Spermatien liegt im Bereich von 0,7–1,5(2) x 2,5–5 µm. Sie sind hyalin und zylindrisch bis schwach allantoid.
Die Hyphen sind 2–2,5(3)µm dick und haben eine glatte Oberfläche. In den braunen Flecken des Kulturtyps 2 werden die Hyphen dicker (2,5–4µm), sind stärker verzweigt, legen sich zu dicken Strängen aneinander und bilden dicke Knoten mit einer Größe von über 100µm. In diesen Knoten sind die Hyphen innen braun gefärbt, weisen aber keine Strukturen (Kristalle o.ä.) auf.

Wachstumsgeschwindigkeit:

Abb.43 zeigt für alle Kulturtypen ein Wachstumsoptimum bei 21°C. Die Kurven setzen sich aus den Mittelwerten der untersuchten Isolate zusammen (Typ 1 fünf, Typ 2 und 3 je drei und Typ 4 sechs Isolate).
Um feststellen zu können, nach welcher Inkubationsdauer und bei welcher Temperatur sich die Kulturtypen unterscheiden, wurden die Zuwachsraten der Isolate separat für jeden Tag und Temperatur mit Hilfe der Varianzanalyse verglichen (Abb.44). Für die Verwerfung der Nullhypothese wurde das Signifikanzniveau bei 5% angesetzt.



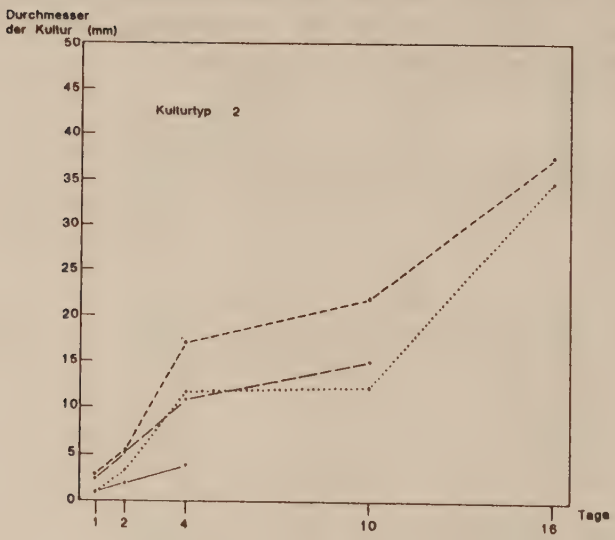
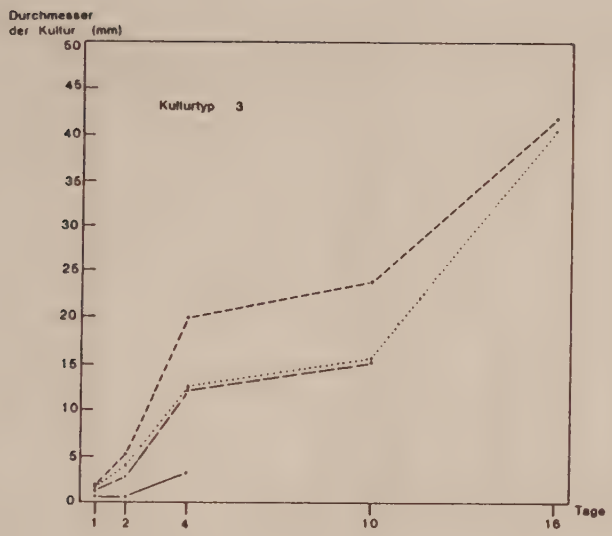


Abb.43: Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturtypen 1 und 2 in Abhängigkeit von der Temperatur.
——— 4°C —·— 12°C - - - - 21°C ····· 27°C



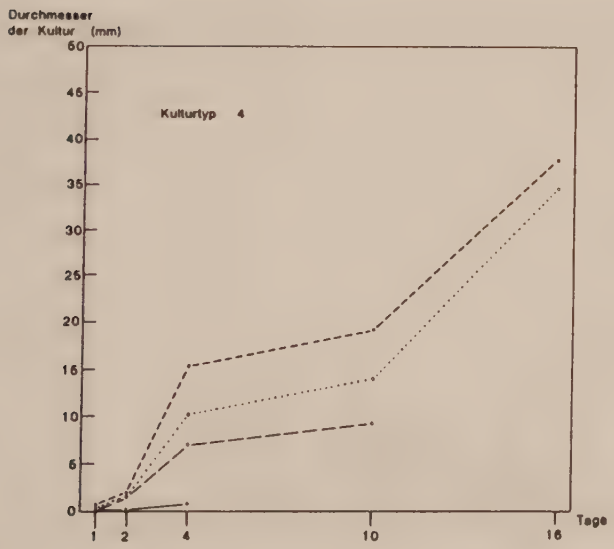
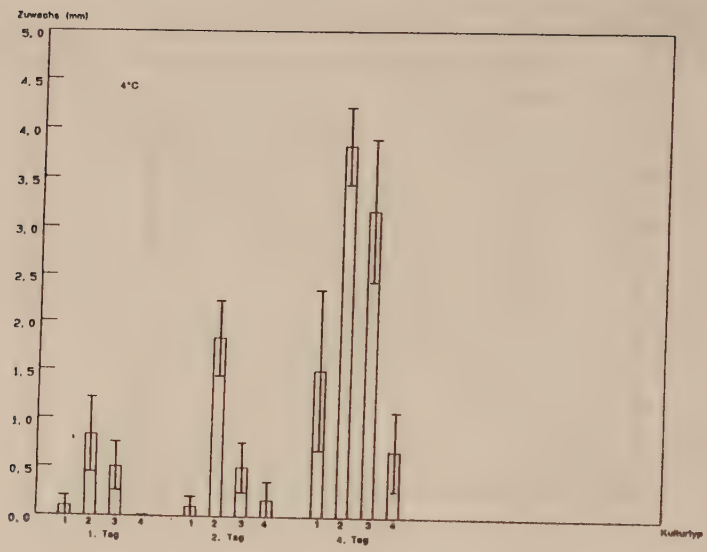


Abb.43: Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturtypen 3 und 4 in Abhängigkeit von der Temperatur.
——— 4°C — — 12°C - - - - 21°C ..... 27°C



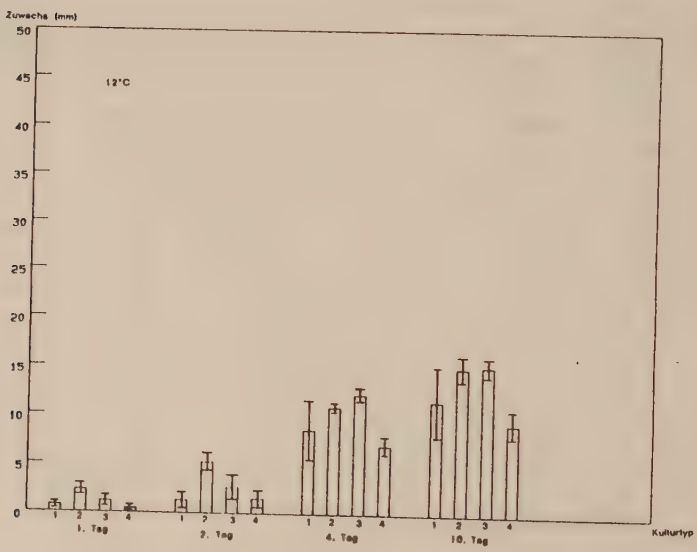
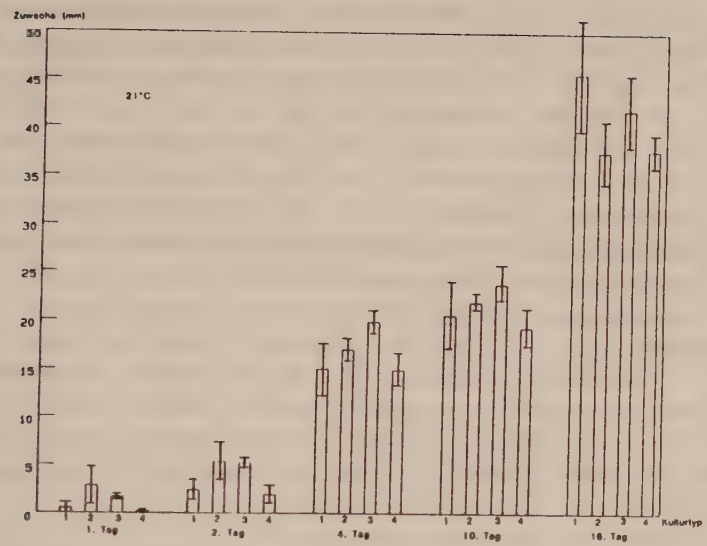


Abb.44: Vergleich der Zuwachsraten der vier Kulturtypen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Temperatur (4°C und 12°C). Die senkrechten Linien geben die Standardabweichung an.



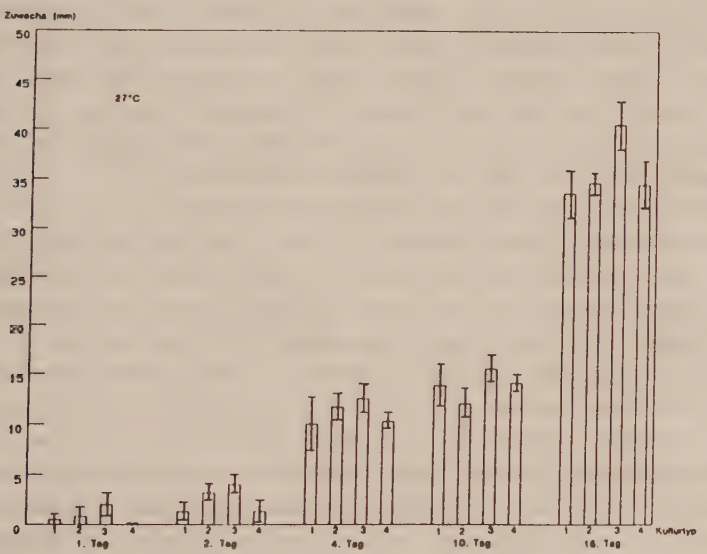


Abb.44: Vergleich der Zuwachsraten der vier Kulturtypen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Temperatur (21°C und 27°C). Die senkrechten Linien geben die Standardabweichung an.

Nur Typ 2 konnte in drei Fällen signifikant von den anderen Typen unterschieden werden: bei 4°/2.Tag hebt er sich von allen anderen Typen ab. Bei 4°/4.Tag und bei 12°/1.Tag ist Typ 2 signifikant schneller als Typ 4. In dem sonst heterogenen Bild läßt sich kein Trend erkennen. Trotz der Sonderstellung von Typ 2 kann die Wachstumsgeschwindigkeit nicht als Unterscheidungskriterium von Kulturvarianten verwendet werden. Entsprechende Unterschiede treten nur in den ersten Tagen nach der Überimpfung des Inokulums auf. Nach weiterer Inkubation verhalten sich alle Isolate in der Wachstumsgeschwindigkeit etwa gleich.

Dualkulturen:

Alle in Dualkulturen bebrüteten Isolate (Tab.18) bildeten beim Zusammentreffen der Mycelien unterschiedlich intensiv gefärbte dunkle Ränder aus. Diese Ränder variierten in Farbe und Breite. Während die breiteren, diffus verlaufenden Ränder (ca. 2-5mm) braun waren (bei Typ 3), wiesen die schmalen (ca. 1mm), scharf abgegrenzten eine schwarze bis dunkelbraune Farbe auf (bei den Typen 1, 2 und 4).

Bei Dualkulturen verschiedener Isolate wurden 2-5mm breite, mycelfreie Hemmzonen ausgebildet, von denen sich die Kulturen mit den schmalen, dunklen Rändern abgrenzten. Diese Ränder waren aber nicht immer auf den Konfrontationsbereich begrenzt; häufig war die gesamte Kultur davon umgeben. Der Rand von Kulturtyp 4 unterschied sich von dem anderer Typen dadurch, daß er (wie in Reinkultur) sehr schmal, hart und bisweilen leicht über den Agar-Nährboden erhaben war.

Unterschiedlich weit war das Luftmycel der Kulturen von den braunen Rändern entfernt. Während es bei Typ 2 und 4 bis zum Rand wuchs, war bei Typ 1 meist ein schmaler Streifen (ca. 2-3mm) mit sehr spärlichem bis keinem Luftmycel zu beobachten. Die Ränder wurden im Konfrontationsbereich von keinem Isolat überwachsen, mit Ausnahme von Typ 4 war ein Überwachsen der Ränder allerdings in den anderen Randbereichen der Kultur möglich.

Typ 3 bildete durchwegs breitere diffuse Ränder aus, die nur im Konfrontationsbereich schmaler waren. Diese Ränder hoben sich häufig durch eine leicht rotbräunliche Farbe von dem eher graubraunen Substratmycel trotz der diffusen Übergänge ab. Am Rand von Sektoren mit dichterem Luftmycel zeigten sich, ähnlich wie bei Typ 2, schärfere Linien, die das Luftmycel deutlich abgrenzten. Diesen schärferen Linien war aber häufig der breitere diffuse Rand "vorgelagert".

Bei Dualkulturen mit Subkulturen desselben Isolates konnte manchmal eine schwache Linie erkannt werden, die aber das Wachstum der Mycelien im Gegensatz zu Dualkulturen verschiedener Isolate nicht behinderte. Hemmzonen bildeten sich in diesem Fall nicht aus.

4.2.2 Zuckerabbau

15 der 21 den Medien zugegebenen Zucker konnten von allen *Lophodermium* - Isolaten abgebaut werden, Ribose dagegen von keinem (Tab.21). Bei den übrigen Zuckern (Arabinose, Lactose, Mannit, Sorbose und Trehalose) zeigten die Isolate - unabhängig vom Kulturtyp - unterschiedliche Ergebnisse.

	Arabinose	Adonit	Dulcit	Fructose	Galactose	Glucose	Inosit	Lactose	Laevulose	Maltose	Mannit	Mannose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Saccharose	Salicin	Sorbit	Sorbose	Trehalose	Xylose
Typ 1																					
1.2	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–	+
1.3	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
1.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
1.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
1.7	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
1.8	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Typ 2																					
2.2	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
2.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Typ 3																					
3.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+
3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
3.6	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Typ 4																					
4.3	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
4.4	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
4.5	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
4.6	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
4.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
4.10	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+

Tab.21: Ergebnisse des Zuckertests

Mit Hilfe der Cluster-Analyse (SPSS/PS⁺ - Programmpaket "Hierarchical Cluster Analysis" Squared Euclidean measure) wurde versucht, die Daten aus Tab.21 zu Gruppen zusammenzufassen. Dabei ergibt sich folgendes Bild:

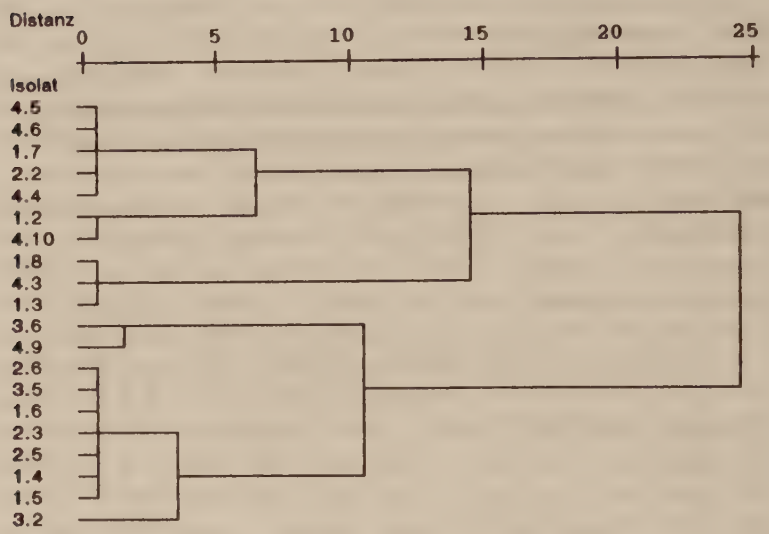


Abb.45: Ergebnis der Cluster - Analyse: Ähnlichkeiten der L. piceae Isolate bezüglich des Abbaus von 21 verschiedenen Zuckern. Der Kulturtyp ist bei der Isolat-Nummer fett hervorgehoben.

Aufgrund der unterschiedlichen Zuckerabbaufähigkeit lassen sich die *Lophodermium* - Isolate in drei bis vier Gruppen aufteilen, die aber (in sich) bezüglich des Kulturtyps sehr heterogen sind. Es lassen sich keine Zusammenhänge mit den Kulturtypen und deren Herkunft (Tab.18) herstellen.

4.2.3 Enzymaktivitäten

Die Inkubation der *Lophodermium* - Isolate auf Spezialnährböden zum Nachweis von Enzymaktivitäten ergab für alle Isolate ausnahmslos einheitliche Ergebnisse:

Enzym	Ergebnis
Amylase	+
Caseinase	+
Cellulase	-
DNAse	-
Lipase	+
Phenoloxidase	+
Protease	+
RNAse	-
Citratabbau	+

Tab.22: Enzymatische Aktivitäten von *L. piceae* auf festen Nährböden.

Unterscheidet man nur zwischen positiven und negativen Nachweisen, ergab der API ZYM - Test im Prinzip das gleiche Ergebnis wie die Tests in den Agarschalen: die Isolate lassen sich aufgrund ihrer Enzymaktivitäten nicht voneinander unterscheiden, da sie alle auf die einzelnen Enzymtests gleich reagieren. Differenziert man aber bei den positiven Nachweisen in ihrer Intensität zwischen schwach (1) bis stark (5), lassen sich Unterschiede feststellen (Tab.23). Die untersuchten Isolate verteilen sich auf fünf mehr oder weniger stark voneinander trennbare Gruppen, die allerdings weder mit den Kulturtypen noch mit den Ergebnissen der Zuckertests in Deckung zu bringen sind.

Isolat	alk.Phosphatase	Esterase (C4)	Esterase Lipase (C8)	Lipase (C14)	Leucin-Aminopeptidase	Valin-Aminopeptidase	Cystin-Aminopeptidase	Trypsin	Chymotrypsin	saure Phosphatase	Phosphoamidase	α-Galactosidase	β-Galactosidase	β-Glucuronidase	α-Glucosidase	β-Glucosidase	β-Glucosaminidase	α-Mannosidase	α-Fucosidase
Typ 1																			
1.2	0/5	3/3	3/3	0/3	0/5	0/3	0/0	0/0	0/0	5/5	4/5	2/4	2/3	0/0	0/3	3/4	1/1	0/4	1/4
1.3	0/5	3/3	4/5	0/3	0/4	0/5	0/0	0/0	0/0	5/5	3/3	2/3	1/4	0/0	0/5	3/4	1/4	0/4	1/3
1.4	0/5	3/3	4/4	0/2	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/4	4/5	0/0	0/5	3/4	1/1	0/4	1/4
1.5	0/5	3/3	4/4	0/3	0/5	0/4	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/4	4/5	0/0	0/5	3/3	1/2	0/3	1/5
1.6	0/5	3/3	4/4	0/4	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	5/4	5/5	1/2	2/4	0/0	0/3	2/2	1/3	0/4	1/4
1.7	0/5	3/3	4/4	0/3	0/5	0/3	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	1/3	3/4	0/0	0/5	3/4	1/2	0/3	1/4
1.8	0/5	3/3	3/4	0/3	0/5	0/4	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/3	4/4	0/0	0/5	2/4	1/2	0/3	1/3
Typ 2																			
2.2	0/5	3/4	4/4	0/3	0/5	0/2	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	1/4	4/5	0/0	0/5	3/4	1/1	0/4	1/5
2.3	0/5	3/3	4/4	0/3	0/4	0/3	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/4	4/5	0/0	0/4	3/4	1/2	0/4	1/5
2.5	0/5	3/3	4/4	0/4	0/5	0/5	0/0	0/0	0/0	4/5	5/4	2/4	3/5	0/0	0/3	3/3	2/3	0/4	1/4
Typ 3																			
3.5	0/5	3/3	4/5	0/5	0/5	0/2	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/3	4/5	0/0	0/5	3/5	1/5	0/4	2/5
3.6	0/4	3/3	4/4	0/4	0/5	0/4	0/0	0/0	0/0	5/5	4/5	1/4	4/5	0/0	0/4	3/2	1/1	0/3	1/4
Typ 4																			
4.3	0/5	3/3	5/5	0/3	0/3	0/3	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/4	4/5	0/0	0/5	3/3	1/3	0/4	2/4
4.4	0/5	3/4	4/4	0/2	0/4	0/5	0/0	0/0	0/0	5/5	4/5	2/5	3/5	0/0	0/4	3/4	2/4	0/4	1/5
4.6	0/5	3/3	4/4	0/3	0/5	0/3	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	1/4	3/5	0/0	0/5	2/3	1/3	0/3	2/5
4.10	0/4	3/3	4/4	0/4	0/5	0/3	0/0	0/0	0/0	5/5	5/5	2/4	4/5	0/0	0/5	3/5	1/5	0/5	1/4

Tab.23: Ergebnisse des API ZYM - Test. Der Schrägstrich (/) trennt die extrazellulären Aktivitäten (links) von den intrazellulären (rechts).

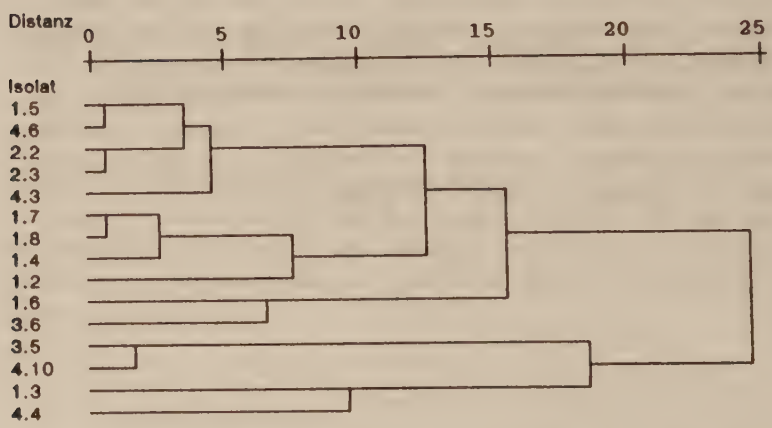


Abb.46: Ergebnis der Cluster - Analyse: Ähnlichkeiten der L. piceae Isolate bezüglich der mit API ZYM bestimmten extra- und intrazellulären Enzymaktivitäten.

Auch die extrazellulären Enzymaktivitäten lassen eine Differenzierung der Pilzisolate nicht zu. Sie können in drei Punkten von den intrazellulären Aktivitäten abweichen:

(1) Die Unterschiede zwischen den Isolaten sind deutlich geringer als bei den intrazellulären Aktivitäten

(2) Bei negativem intrazellulären Nachweis ist auch extrazellulär das Ergebnis negativ (Cystin-Aminopeptidase, Trypsin, Chymotrypsin, β-Glucuronidase)

(3) Bei positivem intrazellulären Nachweis kann extrazellulär entweder ein negatives (alkalische Phosphatase, Lipase C14, Leucin-Aminopeptidase, Valin-Aminopeptidase, α-Glucuronidase, α-Mannosidase) oder ein positives Ergebnis stehen (Esterase C14, Esterase Lipase C8, saure Phosphatase, Phosphoamidase, α-Galactosidase, β-Galactosidase, β-Glucosidase, β-Glucosaminidase, α-Fucosidase).

4.2.4 Isoenzymmuster

Die Analyse der Isoenzyme brachte nur bei drei Enzymsystemen auswertbare Ergebnisse. Die Alkaliache Phosphatase (AKP) konnte bei allen untersuchten Isolaten nicht in verschiedene Allele aufgetrennt und deshalb nicht in die weitere Auswertung einbezogen werden.

Vergleicht man die Bandenmuster der drei Enzymsysteme (Abb.49), läßt sich bei der Sauren Phosphatase (ACP) mit insgesamt vier verschiedenen Allelen die geringste Variabilität der untersuchten Isolate erkennen: die Isolate "2.3", "3.5", "4.10" sowie die Isolate "1.2", "3.6" und "2.5","4.4" weisen jeweils gleiche Banden auf. Bei der Alkoholdehydrogenase (ADH) mit insgesamt sieben und der Lactatdehydrogenase (LDH) mit sechs Allelen besitzen nur je zwei Isolate gleiche Bandenmuster (ADH: Isolate "1.5" und "3.6"; LDH: Isolate "2.3" und "3.5"). Weiterhin kann man feststellen, daß bei der ACP und ADH je zwei Allele bei allen Isolaten vorkommen, bei der LDH ist kein Allel allen Isolaten gemeinsam.

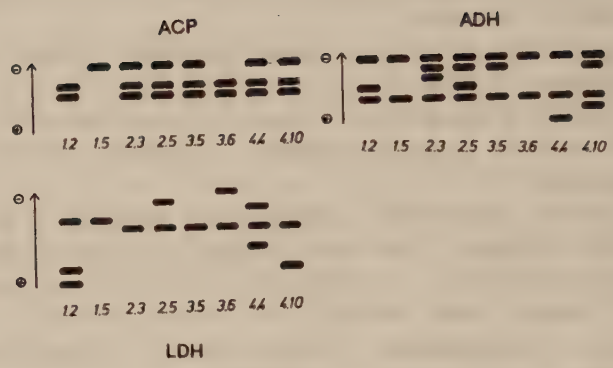


Abb.47: Isoenzymbandenmuster der Sauren Phosphatase (ACP), Alkoholdehydrogenase (ADH) und Lactatdehydrogenase (LDH)

Die mit der Cluster-Analyse verglichenen Bandenmuster der untersuchten Isolate weisen starke Unterschiede auf (Abb.48). Nur die drei Isolate "2.3", "3.5" und "4.10" finden sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit der ACP- und LDH-Banden in einer Gruppe wieder. Diese Isolate sind sich zum Teil auch beim Zuckerabbau ("2.3", "3.5") bzw. beim API ZYM - Test ("3.5", "4.10") ähnlich. Die Ergebnisse der Isoenzymanalysen weisen aber insgesamt betrachtet keine Parallelen mit denen der Zucker- und Enzymaktivitätstests auf.

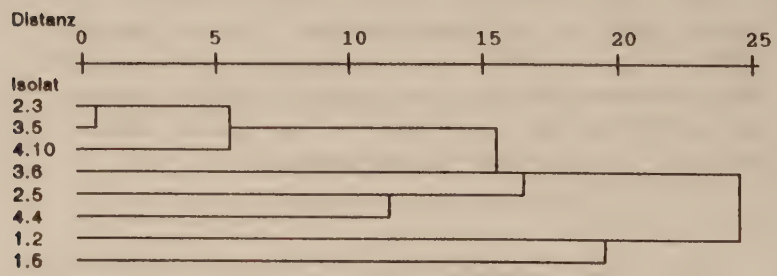


Abb.48: Ergebnis der Cluster - Analyse: Ähnlichkeiten der *L. piceae* Isolate bezüglich der Isoenzymsysteme ACP, ADH, LDH.

5. Diskussion

5.1 Die Endophytenflora in grünen Fichtennadeln

Etwa seit Beginn dieses Jahrzehnts treten in Deutschland neuartige Waldschäden auf, die sich bei der Fichte u.a. in der allmählichen Entnadelung äußern. Neben abiotischen Schadursachen wurde auch die Beteiligung von Pilzen diskutiert. Während REHFUESS & RODENKIRCHEN (1984) Pilze als primäre Verursacher des Nadelfalls betrachten, kommt ihnen nach KOWALSKI & LANG (1984) und SCHÜTT (1985) nur eine sekundäre Bedeutung zu.
Da Pilze nicht immer typische Krankheitsbilder hervorrufen, sondern auch in großer Zahl in symptomlosen grünen Fichtennadeln gefunden werden (CARROLL et al. 1977, BUTIN 1986, SIEBER 1988), ist es schwierig ihre Bedeutung im Zusammenhang mit den Waldschäden einzuschätzen. Um die Kenntnisse über die Lebensweise der Endophyten und eine mögliche pathogene Wirkung auf die Fichte zu erweitern wurde versucht, im Rahmen einer Inventur den Umfang, die Artenzusammensetzung und die Dynamik der Endophytenflora in symtomfreien Fichtennadeln zu erfassen.

Die Inventur der endophytischen Pilze bestätigt mit den Ergebnissen der monatlichen Probenahmen an den Standorten Arber und Deisenhofen die Erwartung, daß grüne Fichtennadeln eine Vielzahl endophytischer Pilze beherbergen. Diese Endophytenflora setzt sich wie auch bei anderen in der Literatur beschriebenen Wirtsarten neben wenigen Ascomyceten überwiegend aus Deuteromyceten (Hyphomyceten und Coelomyceten) zusammen (PETRINI & MÖLLER 1979, LUGINBÜHL & MÖLLER 1980c, WIDLER & MÖLLER 1984, MÖLLER 1985, PETRINI,O. & MÖLLER 1986, SCHNELL 1987, SIEBER & HUGENTOBLER 1987, v.TIEDEMANN et al.1988). Der Anteil an befallenen Nadeln (15,9% - 31,4%) ist im Vergleich mit bisherigen Untersuchungen relativ niedrig. Berücksichtigt man aber, daß es sich hierbei um Jahresmittelwerte handelt, und die monatlichen Häufigkeiten der Endophyten am Arber von 9% (Baum 3 im April) bis zu einen Maximalwert von 50% (Baum 1 im Juni) und in Deisenhofen von 4% (Baum 4 im Mai) bis 39% (Baum4 im September) reichen, liegen diese Werte durchaus im bisher beschriebenen Bereich von 30 - 100% (CARROLL et al. 1977, LUGINBÜHL & MÖLLER 1980c, SCHNELL et al. 1985, v.TIEDEMANN et al. 1988).

Bei Erfassung und Vergleich der Endophytenfloren von Arber und Deisenhofen konnte übereinstimmend mit LUGINBÜHL & MÖLLER (1980c), PE-

TRINI et al. (1982), RIESEN & SIEBER (1985), BARKLUND (1987), SIEBER et al. (1988) und TODD (1988) festgestellt werden, daß Bäume geographisch getrennter Standorte unterschiedliche Artenspektren aufweisen (Abb.17).
Diese Artenspektren differieren nicht nur in ihrer Zusammensetzung sondern auch in den häufigsten Arten. Neben einigen dominierenden Arten (je über 2% Anteil am Gesamtbefall) ist an beiden Standorten eine große Zahl von Pilzen nur vereinzelt isoliert worden (Abb.18; Tab. 5).

Besonderes Augenmerk wurde bei der Inventur auf Arten gelegt, die sehr häufig isoliert oder in der Literatur als Pathogene mit dem Fichtensterben in Verbindung gebracht wurden, z.B. *Lophodermium piceae* und *Rhizosphaera kalkhoffii.*

Am Arber deckt sich die Häufigkeit von *Lophodermium piceae* mit den Ergebnissen von BARKLUND & ROWE (1983), BUTIN (1986), BARKLUND (1987), SIEBER (1988) insoweit, als dieser Pilz mit 19% Anteil am Gesamtbesatz zu den dominierenden Arten der Endophytenflora gehört. Da er aber nur in 4,4% aller untersuchten Nadeln vorkommt, ist er absolut gesehen nicht allzu häufig. In Deisenhofen konnte *L. piceae* insgesamt nur 14 mal isoliert werden (0,6% aller untersuchten Nadeln; 4% des Gesamtbesatzes).
Die Ergebnisse beider Standorte bestätigen zwar die weite Verbreitung von *L. piceae*, eine dominierende Rolle kann diesem Pilz jedoch nicht allgemein zugesprochen werden.
Die Bedeutung von *L. piceae* wird in der Literatur kontrovers diskutiert. REHFUESS & RODENKIRCHEN (1984) sehen in diesem Pilz den Primärerreger der "Nadelröte", BUTIN & WAGNER (1985) konnten ihn dagegen in diesem Zusammenhang nie eindeutig nachweisen. Auch SCHÜTT (1985) sieht in der Literatur keine Hinweise auf einen primären Parasitismus von *L. piceae*. BUTIN (1986) hält *L. piceae* vielmehr für einen Pilz, der lange Zeit symptomlos in grünen Nadeln leben kann und erst zur Fruktifikation kommt, wenn die Nadel durch Alterung oder Witterungseinflüsse und Schadstoffbelastungen geschwächt wurde.
Die eigenen Untersuchungen weisen *L. piceae* überwiegend in Nadeln jungen und mittleren Alters nach. Das deutet darauf hin, daß dieser Pilz im Sinne von BUTIN (1986) und SIEBER (1988) gesunde, grüne Nadeln primär besiedeln und symtomlos darin leben kann. Einen weiteren Hinweis auf eine nicht pathogene Lebensweise sondern eine mutualistische

Beziehung zur Fichte sieht SIEBER (1988) darin, daß bei seinen Untersuchungen der *L. piceae*-Befall kranker Bäume nie größer war als der von gesunden Bäumen. Für diese Lebensweise spricht auch, daß trotz des unterschiedlichen *L. piceae*-Befalls am Arber und in Deisenhofen der Gesundheitszustand der Probebäume beider Standorte gleich gut ist.
L. piceae fruktifiziert im Frühjahr in der Nadelstreu. Die von Mai bis Juli aus den reifen Apothezien entlassenen Ascosporen verursachen zu diesem Zeitpunkt den erhöhten *L. piceae*-Befall aller drei Bäume am Arber, der zum August hin wieder rasch abnimmt.

Den weitaus größten Anteil am Endophytenbesatz hat am Arber *Tiarosporella parca* mit 26% (6% aller untersuchten Nadeln). Auch SIEBER (1988) konnte diesen Pilz in großer Zahl isolieren. Er vermutet, daß eventuell eine Verwechslung der Pyknidien mit *Rhizosphaera kalkhoffii* ein Grund für die wenigen Berichte über *T. parca* in grünen Nadeln sein könnte. Im Gegensatz zum Arber wurde *T. parca* in Deisenhofen in keinem einzigen Fall isoliert. Das könnte an einer regional sehr heterogenen Verteilung dieses Pilzes liegen (HEINIGER & SCHMID 1989), was eine weitere Erklärung für fehlende Berichte über *T. parca* wäre.
Über die Pathogenität dieses Pilzes ist bisher fast nichts bekannt, da er in früheren Arbeiten nur auf absterbenden braunen Nadeln beschrieben wurde (WHITNEY et al. 1975, SUTTON 1980, RACK & BUTIN 1984). Die Berichte über das Vorkommen dieses Pilzes in geschwächten bzw. toten Nadeln und die eigenen Isolierungen aus 5 - 7jährigen Nadeln bei Baum 1 und aus 8jährigen Nadeln bei Baum 2 (Abb.30 und 31) lassen *T. parca* sicherlich nicht als Primärbesiedler von jungen oder gesunden Nadeln einstufen.
Obwohl die Ergebnisse von SIEBER (1988) darauf hinweisen, daß *T. parca* in kranken Bäumen nicht häufiger vorkommt als in gesunden und vermutlich eine mutualistische Beziehung zur Fichte besteht, darf wegen der fehlenden Kenntnisse über eine mögliche Pathogenität *T. parca* aber nicht voreilig als harmloser mutualistischer Nadelendophyt mit Tendenz zur saprophytischen Lebensweise angesehen werden. Die starken Abnahmen der Anzahl von *T. parca* - Isolaten innerhalb eines Monats (Abb.25) lassen sich nämlich nur dadurch erklären, daß die befallenen Nadeln rasch abgeworfen werden. Dieses Verhalten deutet auf eine möglicherweise nicht zu unterschätzende Rolle als Schwächeparasit in älteren Nadeln hin.
Auffallend sind in diesem Zusammenhang auch Ähnlichkeiten zwischen der monatlichen Anzahl der *T. parca* - Isolate und dem Verlauf des

Mittleren Trockenheitsindex MTI*. Das gibt Anlaß zu der Vermutung, daß die Witterung einen starken Einfluß auf die Häufigkeit dieses Pilzes hat. Die zeitliche Verzögerung des *T. parca*-Befalls um einen Monat gegenüber dem Verlauf des MTI könnte dahingehend erklärt werden, daß bei hohen MTI-Werten wegen der hohen Luftfeuchtigkeit viele Sporen keimen. Da die Probenahme noch vor dem Haften der Infektion stattfand, konnten nur wenige Isolate gewonnen werden. Beim nächsten Probenahmetermin wurden die im Vormonat erfolgreich in die Nadel eingedrungenen Pilze isoliert, obwohl der MTI einen niedrigen Wert hat. Die relative Trockenheit (niedriger MTI) verursacht den Abwurf der infizierten Nadeln und eine geringere Zahl von Neuinfektionen, weshalb bei der nächsten Probenahme trotz des hohen MTI wieder weniger Isolate zu finden waren. Die möglichen zeitlichen Abläufe sind in Abb.49 schematisch dargestellt.

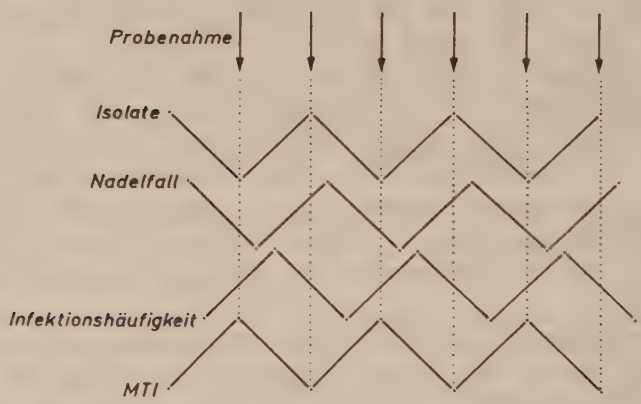


Abb.49: Zeitliche Beziehungen zwischen MTI, Infektionshäufigkeit, Nadelfall und Anzahl der Isolate (Schema). Der zeitliche Abstand zwischen zwei Probenahmen beträgt 1 Monat.

Sehr oft konnte am Arber *Sirococcus myrtilli* isoliert werden (16% des Befalls). BUTIN (1986) und SIEBER (1988) geben die einzigen Hinweise in der Literatur auf die endophytische Lebensweise dieses Pilzes in Fichtennadeln. Beide Autoren fanden *S. myrtilli* aber wesentlich seltener. Die

* Berechnung des MTI vgl. Abschnitt 2.1.1

Bestimmung erfolgte u.a. nach einer Beschreibung von BUTIN (1986), der diesen Pilz als Anamorph der Ascomycetengattung *Godronia* Moug. & Lev. zuordnet.

BUTIN konnte nachweisen, daß *S. myrtilli* die Fichte nur als Nebenwirt besiedelt und auf anderen Gattungen wie *Calluna* und *Vaccinium* fruktifiziert. Diese Wirtsbeziehungen können das starke Auftreten von *S. myrtilli* am Arber gegenüber Deisenhofen erklären, da am Arber deutlich mehr *Vaccinium myrtillus* in der Nähe der Probebäume anzutreffen war als in Deisenhofen. Der Wirtswechsel von *S. myrtilli* deutet auch darauf hin, daß bei der Erfassung des Endophytenbesatzes der Fichte die Begleitflora nicht außer acht gelassen werden darf, da sie die Präsenz der Pilze mit beeinflussen kann. Inwieweit die anderen Endophyten auf Wirte neben der Fichte angewiesen sind, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Wegen des unterschiedlichen Auftretens dieses Pilzes während des Jahres und in den Nadeljahrgängen sind keine Rückschlüsse auf die Lebensweise und die Stellung in der Sukzession der pilzlichen Besiedelung möglich. Nur der Vergleich von Untersuchungsergebnissen mehrerer Jahre könnte Aufschluß darüber geben, ob *S. myrtilli* ein häufiger Fichtenendophyt ist oder ob der große Anteil am Befall im Untersuchungsjahr 1986 die Ausnahme war.

Von den anderen häufigen Arten am Arber (über 2% Anteil am Befall) ist das Vorkommen von *Rhizosphaera kalkhoffii* erwähnenswert, einem Pilz, der von REHFUESS & RODENKIRCHEN (1984) neben *Lophodermium piceae* als Erreger der "Nadelröte" betrachtet wird. Diese Art wird dagegen von BUTIN (1986) nicht als typischer Endophyt und Primärerreger von Nadelkrankheiten angesehen, weil sie nach epiphytischer Lebensweise erst in irreversibel geschädigte Nadeln einzudringen vermag, und daher auch von KOWALSKI & LANG (1984) und BUTIN & WAGNER (1985) häufig aus braunen Nadeln isoliert werden konnte. Auch SIEBER (1988) führt die geringe Zahl von *R. kalkhoffii* - Isolaten darauf zurück. Die eigenen Untersuchungen weisen *R. kalkhoffii* ebenfalls nur in vereinzelten Isolaten nach, die Isolate stammen aber aus grünen, symptomfreien Nadeln aller Altersstufen (vgl. Anhang). Die Einordnung von *Rhizosphaera kalkhoffii* zu den saprophytisch lebenden Arten darf deshalb nicht zu eng gefaßt werden, wenngleich die in der Literatur beobachtete häufige Präsenz dieses Pilzes in absterbenden oder toten Nadeln eine Tendenz von mutualistischer zu saprophytischer Lebensweise erkennen läßt.

Der Anteil der *Xylariaceae* am Endophytenbefall grüner Nadeln ist in Deisenhofen überraschend groß (51%). Die den Formgattungen *Geniculosporium*, *Nodulisporium* und *Rhinocladiella* zugehörigen Anamorphe und *Xylaria spp.* konnten auch ein Jahr später (1987) am 13km entfernten Standort Sauerlach in großer Zahl isoliert werden (69% des Befalls). Die dominierende Präsenz der *Xylariaceae* (Haupt- und Nebenfruchtform) scheint für die Standorte südlich von München kein Ausnahmefall zu sein und läßt vermuten, daß diese Pilze mit regional sehr unterschiedlicher Häufigkeit auftreten (am Arber beträgt der Anteil der *Xylariaceae*-Haupt- und Nebenfruchtformen - insgesamt nur 7% des Befalls). Die weite Verbreitung der *Xylariaceae* im Pflanzenreich (PETRINI & PETRINI 1985) weist auf eine geringe Wirtsspezifität dieser Pilzgruppe hin. Die hauptsächlich saprophytisch lebenden *Xylariaceae* konnten schon von CARROLL et al. (1977) aus lebenden Nadeln mehrerer europäischer Koniferenarten (auch der Fichte) isoliert werden.
Die hohe Zahl der Isolate aus Nadeln jungen und mittleren Alters (Baum 5, Deisenhofen) (Abb.34) spricht dafür, daß *Xylariaceae* nicht nur saprophytisch sondern auch in einer mutualistischen Beziehung zum Wirt leben können. Die Umstellung auf eine mehr abbauende, saprophytische Lebensweise in den alten Nadeln und ein damit verbundener Nadelfall könnte die Abnahme der Isolate in den älteren Nadeljahrgängen von Baum 5 erklären.
Die Häufigkeitsverteilung von *Nodulisporium spp.* in Baum 4 (Deisenhofen) läßt mit den Maxima im 3. und 7. Nadeljahrgang keine klare Bevorzugung eines bestimmten Nadelalters erkennen (Abb.33).
Inwieweit von den *Xylariaceae* und ihren Anamorphen wegen der Fähigkeit Cellulose und Lignin abzubauen eine pathogene Wirkung auf grüne Koniferennadeln ausgeht, ist nicht bekannt (PETRINI & PETRINI 1985).

Die zu den *Cryptococcaceae* gehörende Hefe *Candida friedrichii* kann wohl trotz ihres Anteils von 9% am Befall in Baum 5 (Deisenhofen) nicht als typischer Endophyt in Fichtennadeln gewertet werden, da dieser Pilz vermutlich wegen der für Hefen und Bakterien nicht unüblichen Lebensweise in den Stomata bei der Oberflächensterilisation der Nadeln nicht abgetötet wurde.

Bei der Vielzahl der nur sporadisch auftretenden Arten (Anteil am Befall unter 2%) an den Standorten Arber und Deisenhofen ist die Beurteilung ihrer Wirtsspezifität und der Beziehung zur Fichte wegen der geringen Zahl der Isolate nur schwer möglich. In diesen Fällen kann es sich um

zufällige Infektionen handeln. Bei bekannter Lebensweise einiger dieser Arten lassen sich jedoch Rückschlüsse auf ihre Stellung in der Sukzession von pilzlichen Erstbesiedlern zu Saprophyten in toten Nadeln ziehen. So ist es, wie die Isolate belegen, bei den koprophilen Arten *Podospora setosa* und *Sordaria fimicola* durchaus möglich, daß unter bestimmten Umständen geschwächte Nadeln infiziert werden können. Eine Fruktifikation in der Nadel ist bei solchen Arten allerdings unwahrscheinlich (BUTIN 1986).
Als weitere wirtsunspezifische, zum Teil saprophytisch lebende Arten konnten u.a. *Aureobasidium pullulans*, *Coniothyrium fuckelii*, *Epicoccum purpurascens*, *Phomopsis spp.*, *Sclerophoma pithyophila*, und *Thysanophora penicillioides* isoliert werden. Auch pathogene Arten wie *Sirococcus strobilinus* oder *Cyclaneusma minus* konnten in wenigen Fällen in symptomlosen, grünen Nadeln nachgewiesen werden.

Die Liste der isolierten Pilze (Tab.5 und 11) und die Ergebnisse früherer Arbeiten zeigen, daß neben typischen Fichtenendophyten wie z.B. *Lophodermium piceae* und *Tiarosporella parca* eine große Zahl von Pilzen auftreten, die wegen ihrer koprophilen (*Sordaria spp.*, *Podospora spp.*) saprophytischen (*Xylaria spp.*) oder pathogenen (*Cyclaneusma minus*, *L. macrosporum*, *Sirococcus spp.*, *Phomopsis spp.*) Lebensweise bekannt sind. Diese Pilze könnte man als "fakultative Endophyten" bezeichnen, die "friedlich" in gesunden, symptomfreien Nadeln leben können, gemäß ihrer sonst bekannten Lebensweise aber Nadeln bestimmten Alters bevorzugen. Wegen der schon genannten geringen Häufigkeit dieser Arten ist die Beurteilung ihrer Bedeutung und Beziehung zur Fichte schwierig, eine Rolle als Schwächeparasit, der den Abwurf entsprechend vorgeschädigter Nadeln auslöst, kann ihnen aber nicht zugeschrieben werden.

Warum Basidiomyceten als Endophyten in Fichtennadeln nicht relevant sind, obwohl sie in der Mycorrhiza ein endosymbiontisches Verhältnis zu höheren Pflanzen eingehen können, ist nicht bekannt und wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen im Rahmen der Endophytenproblematik.

Das Krankheitsbild der Fichte zeichnet sich unter anderem dadurch aus, daß die ältesten Nadeln vorzeitig abgeworfen werden. Um eine mögliche Beteiligung von Pilzen – z.B. in Form einer übermäßigen Zunahme des

Pilzbesatzes oder bestimmter Arten während einer "symptomfreien Endophytenphase" - erkennen zu können, erstreckte sich die Inventur nicht nur auf die Erfassung des allgemeinen Artenspektrums sondern sie erfaßte auch die Besiedelung von Nadeln unterschiedlichen Alters. Zusätzlich wurden die Einflüsse der Witterung auf das Besiedelungsmuster der Nadeljahrgänge berücksichtigt.

Eigentlich wäre eine Zunahme in der Anzahl der Isolate mit dem Nadelalter zu erwarten gewesen, denn alte Nadeln sind länger dem Infektionsdruck ausgesetzt als junge. In Wirklichkeit nahm aber die Besiedelungsdichte in den alten Jahrgängen ab (Abb.12 und 13). Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, daß die infizierten Nadeln etwas schneller altern als die nichtinfizierten und eher abgeworfen werden. Der Anteil nichtinfizierter Nadeln nimmt deshalb zu.
Der an beiden Standorten stattfindende verstärkte Rückgang der alten Nadeln im Herbst (Abb.14 und 15) ist aber eher mit dem physiologisch bedingt verstärkten Nadelfall in dieser Jahreszeit zu erklären.
Eine andere Art, sich eines Parasiten zu entledigen wurde von WARGO (1975) beschrieben. *Acer saccharum* und drei *Quercus*-Arten lysieren enzymatisch die Zellwände von *Armillaria mellea*. Die aktive Beseitigung des Pilzes durch den Wirt scheint bei der Fichte gegenüber den Nadelendophyten nicht vorzukommen, da die Bildung entsprechender Enzyme wahrscheinlich durch die Anwesenheit der Pilze induziert wird, eine Begrenzung der Enzymaktivitäten auf einzelne Nadeljahrgänge aber nicht plausibel ist.
Auffallend ist am Arber die starke Zunahme der Endophytenzahl vom 4. zum 5. Nadeljahrgang (Abb.12). Es läßt sich vermuten, daß ein Zusammenhang mit der Witterung der vergangenen Jahre besteht. Der mittlere Trockenheitsindex (MTI)* der Jahre 1978 - 1981 (Abb.4) weist hohe Werte auf, die ein für Pilzinfektionen günstiges (=feuchtes) Klima erkennen lassen. Die zu dieser Zeit vorhandenen Nadeln wurden daher wohl vergleichsweise stark von Pilzen befallen. Die 1983 gebildeten Nadeln (zum Zeitpunkt der Probenahme der 4.Jahrgang) waren wegen der herrschenden Trockenheit (niedrigster Wert des MTI) einem wesentlich geringeren Infektionsdruck ausgesetzt, der sich offensichtlich trotz der Infektionen in den Folgejahren gegenüber den älteren Nadeln nicht ausgleichen konnte, da sich der Infektionsdruck und die daraus erfolgten Neuinfektionen von Jahr zu Jahr aufaddieren. Derartige witterungsbe-

---

* Berechnung des MTI vgl. Abschnitt 2.1.1

dingte Einbrüche oder Spitzen in der Endophytenzahl bleiben in dem entsprechenden Jahrgang vermutlich so lange erhalten und erkennbar, bis die Nadeln absterben und abgeworfen werden. Es ist demnach anzunehmen, daß diese Knicke jedes Jahr einen Jahrgang weiter "wandern".

Die Anhäufung speziell von *Tiarosporella parca* im 5. - 7. Jahrgang scheint aber weniger mit Witterungseinflüssen vergangener Jahre als mit der bevorzugten Besiedelung von Nadeln dieses Alters zusammenzuhängen. *T. parca* hat sich außerdem mit den oben beschriebenen starken Häufigkeitsveränderungen innerhalb von Monatsintervallen (Abb.25) als ein Pilz erwiesen, der sehr rasch auf veränderte Witterungsbedingen reagieren und vermutlich den Verlust der befallenen Nadeln ebenso kurzfristig auslösen kann. Das Verbleiben von *T. parca* befallener Nadeln am Baum über mehrere Jahre hin ist daher unwahrscheinlich.

In den meisten Fällen kann nicht direkt oder indirekt - wie bei *T. parca* - festgestellt werden, wie lange sich ein Pilz schon in der Nadel befindet. Eine Antwort auf diese Frage könnte nur dann gefunden werden, wenn sich die Inventur der Endophytenflora über mehrere Jahre hinweg erstreckt.

Bei der Inventur der Endophytenflora wurden neben der Artenzusammensetzung und deren Abhängigkeit vom Nadelalter auch die monatlichen Veränderungen während des Jahres 1986 erfaßt. Dabei wurde untersucht, ob die Witterung in dem Jahr bzw. dem Monat der Probenahme maßgeblich den Endophytenbesatz, insbesondere die Häufigkeit der dominierenden Arten beeinflußt.

Bei der Analyse der monatlichen Endophytenzahl ist zu berücksichtigen, daß sich die Kurven in Abb.6 und 7 aus der Überlagerung der unterschiedlichen Häufigkeiten mehrerer Pilze zusammensetzen. Deswegen ist eine getrennte Betrachtung vor allem der dominierenden Arten notwendig.
Der Gesamtendophytenbesatz am Arber weist sehr starke und kurzfristige, monatliche Veränderungen auf (Abb.6), die wie oben schon ausgeführt, im wesentlichen von *Tiarosporella parca* hervorgerufen werden (Abb.25). Überlagert wird die *Tiarosporella*-Kurve von *Lophodermium piceae*, das eine vom jährlichen Lebenszyklus bedingte Kurve hat (größte Befallshäufigkeit in Juni/Juli). Die Überlagerung durch *Sirococcus myrtilli* kommt nicht stark zum tragen, da im Vergleich zu den beiden vor-

genannten Arten keine großen monatlichen Veränderungen der Häufigkeit auftreten. In Deisenhofen spiegelt sich in der monatlichen Kurve der Endophytenzahl die Häufigkeit von *Nodulisporium spp.* (Baum 4) und *Geniculosporium spp.* (Baum 5) wieder.
An beiden Standorten haben alle übrigen Arten in ihrer Gesamtheit nur wenig Einfluß auf die Veränderungen der Gesamtzahl der Isolate pro Baum bzw. Standort. Es sind zwar ähnliche Änderungen in der Anzahl wie bei den dominierenden Arten erkennbar (Abb.50), sie sind aber zu gering, um den Gesamtbefall deutlich zu beeinflussen.

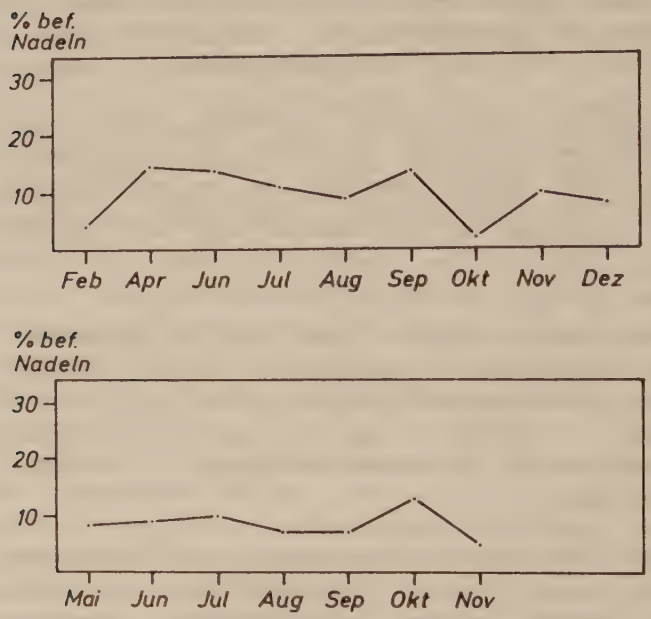


Abb.50: Monatliche Anzahl befallener Nadeln (in %) ohne die dominierenden Arten.
a) Arber; ohne *L.piceae, S.myrtilli, T.parca.*
b) Deisenhofen; ohne *Nodulisporium spp. Geniculosporium spp. Xylaria spp.*

Diese Ergebnisse zeigen, daß Veränderungen in der Endophytenzahl hauptsächlich von den dominierenden Arten verursacht werden. Oder anders gesagt: Faktoren wie z.B. Witterung, Lebenszyklus und Existenz von

eventuell notwendigen weiteren Wirtspflanzen werden zahlenmäßig bei den dominierenden Arten am deutlichsten sichtbar.

Bei der Beschreibung des Schadbildes der Fichte wurden auch die verschiedenen Verzweigungsformen miteinbezogen. Der in diesem Zusammenhang entstandene Begriff "Lamettasyndrom" ist nach ELSTNER & OSSWALD (1984) die Folge einer Reihe von Schädigungen, die das schlaffe Herabhängen der Zweige 2. Ordnung verursachen. Die anderen Verzweigungsformen (Bürsten- und Plattentyp) wären demnach weniger vom Waldsterben betroffen als Fichten mit herabhängenden Zweigen, die von PRIEHÄUSSER (1958) und SCHMIDT-VOGT (1977) unabhängig von Erkrankungen als Kammtyp bezeichnet werden.
SCHÖTT et al. (1984) und ZIEGLER (1986) sehen im Herabhängen der Zweige 2. Ordnung kein Krankheitssymptom, behalten aber den Begriff "Lamettasyndrom" bei. Auch BAUER (1986) und MAURER (1987) konnten die Hypothese von ELSTNER & OSSWALD (1984) entkräften. MAURER (1987) stellte sogar bei den Fichten des Plattentyps eine signifikant stärkere Schädigung als beim Kammtyp fest.
Da die Zusammensetzung der Endophytenflora auch von individuellen Unterschieden der Wirtspflanzen (z.B. unterschiedliche Erbanlagen [MÜLLER 1987, pers.Mitt.] und Vitalität [SIEBER 1988, SIEBER & HUGENTOBLER 1987]) beeinflußt wird, ergab sich die Frage, inwieweit sich Platten- und Kammfichten im Endophytenbesatz unterscheiden.
In diesem Zusammenhang war es auch interessant zu wissen, ob die unterschiedliche Verzweigungsform unter Berücksichtigung des Strömungsfeldes der Luft am Einzelbaum Dichte und Verteilung des Endophytenbefalls innerhalb der Krone beeinflußt. Nach RUCK & SCHMITT (1986) ist die Höhe der Depositionsraten (z.B. von Luftschadstoffen und Pilzsporen) bei überströmten Flächen von den Turbulenzintensitäten der Strömung abhängig. Die Grobstruktur eines Bestandes (Dichte, Stufigkeit, Kronendachrauhigkeit) beeinflußt das vertikale Windprofil in und über Beständen (FRIEDLANDER & JOHNSTONE 1957, MAYER 1978, MERONEY 1968, ROUHIAINEN & STACHIEWICZ 1979) und kann zu einer Zunahme der Befallshäufigkeit im oberen Kronenbereich führen (MÜLLER 1987, pers. Mitt.).
Das Strömungsfeld am Einzelbaum weist im Gegensatz zum geschlossenen Bestand wegen der höheren Winddurchlässigkeit und der geringeren Beeinflussung durch Nachbarbäume Turbulenzen auf, die so weit von der

Krone entfernt sind, daß Luv- und Leeseite in gleicher Richtung vom Wind durchströmt werden (RUCK & SCHMITT 1989).

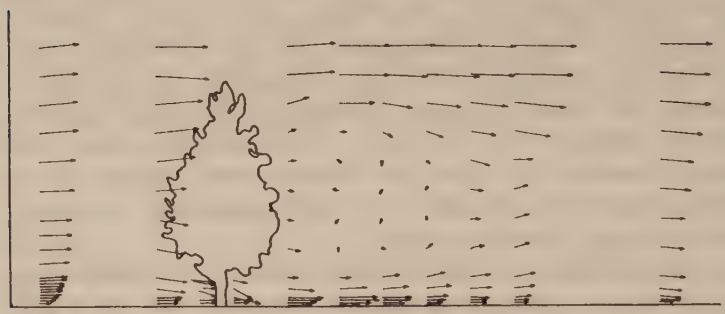


Abb.51: Strömungsbild am Einzelbaum. Meßebene ist die Mittenebene. (verändert nach RUCK & SCHMITT 1986)

Basierend auf diese Grundlagen bestätigte sich die Erwartung, daß morphologische Parameter in der Oberkrone von Platten- und Kammfichten zusammen mit der Windrichtung die Verteilung des Endophytenbesatzes beeinflussen.

Der Luv-Befall der Kammfichten ist höher als der beim Plattentyp. Dies ist vermutlich auf die größere dem Wind zugewandte Fläche der Kammfichtenzweige und die damit größere "Auskämmwirkung" auf Pilzsporen zurückzuführen.

Das deutlich ausgeprägte Luv-Lee-Gefälle der Endophytenzahl des Kammtyps wird von den senkrecht herabhängenden Zweigen 2.Ordnung verursacht. Beim Plattentyp kann der Wind über die Zweige 2.Ordnung der Luv- und Leeseite besser hinwegstreichen (Abb.35) und verursacht damit einen geringeren Unterschied des Pilzbefalls auf beiden Seiten.

Der Vergleich des Gesamtbefalls der Bäume beider Typen (Tab.8) läßt keine Aussage darüber zu, daß Platten- und Kammfichten unterschiedlich anfällig gegenüber Pilzbefall sind. Diese Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, daß die Verzweigungsform die Verteilung der Endophyten innerhalb der Krone beeinflußt, weniger aber den Gesamtbefall. Tab.8 mit den zusammengefaßten Daten von Sauerlach und Bodenmais stellt diesen Sachverhalt eindeutig dar.

Die Verteilung der Endophyten gab auch zu der Überlegung Anlaß, daß sich luftgetragene Schadstoffe in Abhängigkeit von der Verzweigungsform in unterschiedlicher Intensität auf den Nadeln ablagern, ins Gewebe aufgenommen werden und die Präsenz und Verteilung der Pilze beeinflussen. Von STIMM (1986, pers.Mitt.) durchgeführte Elementanalysen an den Nadeln der Bäume in Bodenmais ließen jedoch keinen der Pilzverteilung ähnlichen Effekt erkennen.

Im Zuge der Ursachenforschung des Waldsterbens stellten sich Luftschadstoffe als einer der Hauptverursacher der Waldschäden dar. Wie diese Pollutantien das Wirt-Parasit-Verhältnis beeinflussen, konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden (SCHOTT et al. 1987). Um herauszufinden, ob Pollutantien auf nadelbewohnende Pilze einwirken, mußten Versuche mit Pilzkulturen im Labor durchgeführt werden. In Anlehnung an den Verdacht von HOMMEL (1985) und SCHULTE-ÜBBING (1986) wurde auch die Wirkung von technischen Mikrowellen auf Pilze in vitro untersucht.

Nach den durchgeführten *in vitro*-Versuchen scheinen die Schadgase Ozon und Schwefeldioxid auf die verwendeten Pilzstämme keinen Einfluß zu haben. Die Ergebnisse zeigten keine wesentlichen Einwirkungen auf die Vitalität dieser Pilze. Bei Übertragung dieser Versuche auf Standortsbedingungen kann man davon ausgehen, daß eine mögliche Veränderung der Endophytenflora in Gebieten mit hoher O_3- und SO_2-Belastung eher durch eine akute oder chronische Schädigung des Wirtes bedingt ist, die es Schwächeparasiten oder mehr saprophytischen Pilzen ermöglicht die Nadeln erfolgreich zu infizieren. Dabei darf aber nicht der Umkehrschluß gezogen werden, daß Standorte oder Bäume mit unterschiedlicher Endophytenflora auch unterschiedlich geschädigt wären. Der gleiche Gesundheitszustand aber verschiedene Endophytenbesatz der Probebäume an Arber und Deisenhofen (Abb.16-18) bestätigt diesen Sachverhalt.

Radiowellen und elektrische Felder hatten auf die inkubierten Pilzkulturen keine nennenswerte Wirkung. Da auch in der Literatur keine Hinweise auf ein verstärktes oder fehlendes Auftreten von Pilzen im Bereich von Sende- und Radaranlagen vorliegen, läßt sich vermuten, daß die Endophytenflora nicht beeinflußt wird.

Zusammenfassend stellt sich die Endophytenflora in grünen, gesunden Fichtennadeln als ein komplexes und dynamisches System dar, das sich

neben wenigen dominierenden Arten aus vielen nur selten auftretenden Pilzen zusammensetzt. Pathogene Arten, die als Primärverursacher von Schäden, insbesondere im Zusammenhang mit den "neuartigen Waldschäden", in Frage kommen, konnten nicht nachgewiesen werden. Bei einzelnen Isolaten besteht jedoch der Verdacht, daß sie als Schwächeparasiten bei älteren Nadeln vorzeitig den Abwurf auslösen. Ein Einfluß der Witterung ist dabei anzunehmen.
Das endophytische Vorkommen koprophiler, saprophytischer oder pathogener Pilze läßt vermuten, daß das Gewebe gesunder Fichtennadeln ein Biotop für viele wirtsunspezifische Pilze darstellt, die wegen der ihnen eigenen Lebensweise Nadeln eines bestimmten Alters bevorzugt besiedeln können.

5.2 Variabilität von Lophodermium piceae in vitro

Die Diskussion um eine Beteiligung nadelbewohnender Pilze am Schadbild der Fichte lenkte das Interesse auch auf Pilze, die entweder wegen ihrer Häufigkeit oder ihres Auftretens in Schadgebieten als Verursacher von Nadelkrankheiten verdächtigt wurden. So wurde, wie oben bereits ausgeführt, von REHFUESS & RODENKIRCHEN (1984) u.a. *Lophodermium piceae* als Erreger der "Nadelröte" angesehen. Auch wenn die Literatur (BUTIN 1986, SIEBER 1988) und die eigenen Ergebnisse der Endophyteninventur darauf hindeuten, daß *L. piceae* ein Schwächeparasit ist, der lange Zeit symptomlos in grünen Fichtennadeln leben kann, sind Untersuchungen zur Biologie dieses Pilzes von grundsätzlicher Bedeutung, da die Kenntnisse über die Funktion in der endophytischen (und symptomfreien) Phase noch lückenhaft sind. Die mehrfachen Beobachtungen, daß *L. piceae*-Isolate in Kultur eine auffallende Variabilität aufweisen (RACK & BUTIN 1984, BUTIN pers.Mitt.), ließen mögliche genetische Unterschiede vermuten, bei denen auch ein Zusammenhang mit einer pathogenen Bedeutung nicht auszuschließen war.

Während der Inventur der Endophytenflora an den Standorten Arber und Deisenhofen bestätigten sich die Hinweise auf die Variabilität des Kulturbildes von *L. piceae*. Diese Isolate wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet, um mögliche Zusammenhänge zwischen dem Kulturbild und dem zeitlichen oder regionalen Auftreten des Pilzes erkennen zu können.

Die Untersuchungen zur Variabilität von *L. piceae* sollten feststellen, ob sich aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale die Vermutung einer Rassenbildung erhärten läßt und ob eine Korrelation zwischen Herkunft des Isolates und dem Auftreten bestimmter Merkmale oder Merkmalskombinationen besteht.

Der Versuch, die Variationen des Kulturbildes zu erfassen und zu gruppieren, gestaltete sich - wie auch sonst bei taxonomischen Klassifizierungen - schwierig, da Anhaltspunkte für die Gewichtung von Merkmalen fehlen und eine gewisse Variabilität innerhalb systematischer Taxa durchaus normal ist.
Eine Möglichkeit einer Gruppierung bestand darin, die Häufigkeit und Konstanz bestimmter Merkmale als Auswahlkriterium zu nehmen und dann aufgrund von Merkmalskombinationen die Gruppierung vorzunehmen. Daraus ergaben sich die in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen vier Kulturtypen. Wegen des hohen Anteils von Isolaten (30%), die sich keinem dieser Kulturtypen zuordnen ließen und auch wegen der unscharfen Abgrenzung wurde versucht, die Zahl der Gruppen zu verändern. Die Verringerung auf drei oder zwei Gruppen wurde deshalb verworfen, weil es die Kombination häufiger Merkmale, wie z.B. Dichte und Farbe des Luftmycels und Randbildung in Einzelkultur nicht zuließ. Außerdem ist die geringe Zahl der Gruppen der großen Variabilität des Kulturbildes entgegengestanden. Die andere Möglichkeit, die Zahl der Gruppen so lange zu erhöhen, bis bei möglichst vielen Isolaten eine Zuordnung möglich ist, würde die Zahl der Isolate innerhalb der Gruppen so stark verringern, daß die Einteilung fragwürdig erscheint. Die Festlegung auf vier Kulturtypen ist daher als Kompromiß anzusehen, der möglichst viele Isolate in möglichst wenigen Gruppen zusammenfaßt.

Da phänotypische Merkmale allein - wie diese Ergebnisse zeigen - eine Gruppeneinteilung nicht rechtfertigen können, wurden die *L. piceae*-Isolate auch auf physiologischer und genetischer Ebene untersucht. *L. piceae* erwies sich auch bei diesen Untersuchungen als sehr variabel. Die mit der Cluster-Analyse errechneten Ähnlichkeiten der Isolate lassen aber keine Übereinstimmungen der einzelnen Untersuchungsergebnisse erkennen. Da morphologische und physiologische Eigenschaften genetisch fixiert sind, wurde versucht, die Gruppenbildung auf der Basis der Isoenzymmuster (Abb.48) durchzuführen. Mit diesen Ergebnissen konnte jedoch keine Gruppierung geschaffen werden, die Rückschlüsse auf die

Herkunft der Isolate oder auch Übereinstimmung mit den anderen Merkmalen der untersuchten Isolate erkennen ließ.

Im Hinblick auf ein eventuell unterschiedliches Verhalten von *L. piceae* wurden die bei den Tests zusammengefaßten Gruppen und auch die Kulturtypen auf ihre Herkunft hin (Standort, Baum, Nadeljahrgang, Monat der Isolierung) überprüft. Bei keiner dieser Gruppen ließ sich eine Korrelation mit der Herkunft nachweisen.
Da auch in den Dualkulturen kein dominanter Kulturtyp auftiel und sich die Isolate aufgrund ihrer Wachstumsgeschwindigkeit nicht unterscheiden lassen, kann aufgrund der Untersuchungsergebnisse kein Hinweis auf ein zeitlich oder regional unterschiedlich häufiges Auftreten gewonnen werden.

Bei den Enzymtests auf Spezialmedien wurde eine starke Amylase-Aktivität sichtbar (Tab.22). Die Fähigkeit Stärke zu hydrolysieren und auch viele verschiedene Zucker abzubauen könnte während der endophytischen, symptomlosen Lebensweise von *L. piceae* in Fichtennadeln eine Rolle spielen. Die positiven Aktivitäten von Lipasen, Phenoloxidasen und Proteasen deuten aber auch darauf hin, daß sich *L. piceae* nicht nur von Assimilaten ernährt. Inwieweit diese Enzymaktivitäten mit einer abbauenden Tätigkeit von geschwächtem Wirtsgewebe zusammenhängen kann derzeit nicht beantwortet werden.

Die fehlende Übereinstimmung morphologischer und physiologischer Eigenschaften der untersuchten Isolate läßt keine alle Merkmale umfassende Gruppierung zu. Die Vermutung, *L. piceae* würde verschiedene Rassen bilden ist daher mit dem geprüften Material nicht nachweisbar. Eine Übertragung der Resultate allgemein auf *Lophodermium piceae* ist wegen des Umfanges dieser Untersuchungen (Anzahl der Isolate, regionale Begrenzung) nicht möglich. Die starke Variabilität dieses Pilzes kann aber ein Ausdruck von großer Anpassungsfähigkeit sein, die der Grund für seine weite Verbreitung sein könnte.

6. Zusammenfassung

In der Literatur wurde die Beteiligung von Pilzen an der allmählichen Entnadelung, dem am meisten auffallenden Schadbild des Waldsterbens bei der Fichte (*Picea abies* [L.]Karst.), unterschiedlich beurteilt. Da auch endophytische Pilze in großer Frequenz symptomfreie Nadeln besiedeln, war nicht auszuschließen, daß sie das Verhalten des Wirtes gegenüber Umwelteinflüssen verändern, möglicherweise lange bevor typische Krankheitssymptome auftreten.

Um die Bedeutung dieser Pilze einschätzen zu können, wurden im Rahmen einer Inventur während des Jahres 1986 an zwei Standorten (Arber und Deisenhofen) Umfang, Artenzusammensetzung und Dynamik der Endophytenflora in symptomfreien Fichtennadeln erfaßt. Außerdem wurde untersucht, welche Wirkung ausgewählte Pollutantien auf Endophyten in vitro haben.
Die auffallende Variabilität des Kulturbildes der *Lophodermium piceae* -Isolate war Anlaß für morphologische, physiologische und genetische Untersuchungen, um Aufschluß über eine mögliche Rassenbildung und eine eventuell damit verbundene pathologische Bedeutung dieses Pilzes zu gewinnen.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die untersuchten Nadeln der Probebäume am Arber sind im Mittel zu 23,4%, die in Deisenhofen zu 15,4% von endophytischen Pilzen besiedelt. Die Befallshäufigkeit hat einen Maximalwert bei 50% (Arber: Baum 1 im Juni), der niedrigste Wert (4%) wurde in Deisenhofen bei Baum 4 im Mai beobachtet.

2. Die Endophytenflora setzt sich neben wenigen Ascomyceten überwiegend aus Deuteromyceten (Hyphomyceten und Coelomyceten) zusammen. Insgesamt konnten 63 verschiedene Pilzarten aus grünen Nadeln isoliert werden.

3. Die Artenspektren beider Standorte unterscheiden sich signifikant. Individuelle Unterschiede der Probebäume an einem Standort sind geringer als die Standortsunterschiede.

4. Einer großen Zahl nur vereinzelt auftretender Pilze stehen wenige stark dominierende Arten gegenüber. Am Arber sind dies *Tiarosporella parca*, *Lophodermium piceae* und *Sirococcus myrtilli*. Die in Dei-

senhofen dominierenden *Xylariaceae* wurden überwiegend als *Nodulisporium*– und *Geniculosporium*–Anamorphe isoliert.

5. Die Bedeutung einiger häufiger und wichtiger Pilze wird diskutiert:
Lophodermium piceae ist ein weit verbreiteter, nicht pathogener, typischer Fichtenendophyt, der in Nadeln jungen und mittleren Alters lebt. Eine Rolle als Primärverursacher von Schädigungen ist sehr unwahrscheinlich.
Tiarosporella parca besiedelt überwiegend ältere Nadeln, deren Schütte er vermutlich in starker Abhängigkeit von der Witterung rasch auslösen kann.
Sirococcus myrtilli besiedelt die Fichte offensichtlich nur als Nebenwirt, seine Häufigkeit hängt daher von der Präsenz des Hauptwirtes (*Vaccinium sp.*) ab. Die Schädigung der Fichtennadeln ist unwahrscheinlich.
Rhizosphaera kalkhoffii konnte vereinzelt aus grünen Nadeln aller Altersklassen isoliert werden. Eine Tendenz von mutualistischer zu saprophytischer Lebensweise konnte weder bestätigt noch widerlegt werden.
Xylariaceae scheinen in den Wäldern südlich von München die dominierenden Endophyten in Fichtennadeln zu sein. Es kann eine mutualistische und auch saprophytische Lebensweise angenommen werden.

6. Gelegentlich wurden wirtsunspezifische z.T. saprophytisch lebende Pilze wie *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Coniothyrium fuckelii*, *Epicoccum purpurascens*, *Pezicula livida* (inkl. *Cryptosporiopsis*–Anamorph), *Sclerophoma pithyophila*, *Thysanophora penicillioides* isoliert. Auch koprophile (*Sordaria fimicola*, *Podopsora sp.*) und pathogene Arten (*Sirococcus spp.*, *Cyclaneusma minus*, *Lophodermium macrosporum*, *Phomopsis spp.*) konnten nachgewiesen werden.
Das Auftreten dieser und der übrigen Arten zeigt, daß viele Pilze symptomlos in grünen Fichtennadeln leben können. Ubiquisten bevorzugen aber meistens gemäß ihrer sonst bekannten Lebensweise Nadeln eines bestimmten Alters. Eine Sukzession des Besiedelungsmusters in den verschiedenen Nadelaltersklassen wird daher teilweise sichtbar.

7. Die monatlichen Schwankungen der Endophytenzahl und die unterschiedlich dichte Besiedelung der Nadeljahrgänge weisen Ähnlichkeiten mit dem Verlauf der Witterung des Untersuchungsjahres (1986)

bez. der vergangenen 10 Jahre (1976–1986) auf. Die zeitlichen Zusammenhänge eines offensichtlich starken Einflusses der Witterung auf die Endophytenflora werden diskutiert.

8. Die Abnahme der Endophytenzahl in den alten Jahrgängen ist wahrscheinlich auf vorzeitiges Altern und Abwerfen der infizierten Nadeln zurückzuführen.

9. Die unterschiedliche Verzweigungsform von Platten- und Kammfichten beeinflußt die Verteilung der Endophyten in der Krone, nicht aber die Höhe des Gesamtbefalls. Die Strömungsverhältnisse der Luft scheinen dabei eine wesentliche Rolle zu spielen.

10. Die Schadgase SO_2 und O_3 und technische Mikrowellen haben in den vorgegebenen Konzentrationen bzw. Feldstärken keinen nennenswerten Einfluß auf die Vitalität der inkubierten Pilzkulturen.

11. Die Variabilität des Kulturbildes von *Lophodermium piceae* wurde in vier Kulturtypen gruppiert. Die *L. piceae*-Isolate erwiesen sich auch auf physiologischer und genetischer Ebene als sehr variabel. Eine alle Merkmale umfassende Gruppierung war nicht möglich, eine vermutete Rassenbildung von *L. piceae* konnte mit dem geprüften Material nicht nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen der Herkunft der Isolate und dem Auftreten bestimmter Merkmale oder Merkmalskombinationen ist nicht feststellbar.

7. Literaturverzeichnis

Aas,G. (1988) - Untersuchungen zur Trennung und Kreuzbarkeit von Stiel- und Traubeneiche (*Quercus robur* L. und *Q. petraea* [Matt.] Liebl.). Dissertation, Univ. München.

Ainsworth,G.C., F.K.Sparrow & A.S.Sussman (eds.) (1973) - The Fungi - An Advanced Treatise, Vol.4A. Acad.Press, New York.

Andrianovat,T.V. (1986) - Taxonomic criteria of *Septoria* s.l. (*Coelomycetes*). Mikologija i Fitopatologija 20(4):259-265.

Anonym (1984) - Endophytische Pilze. ETH Zürich, Jahresberichte 1984 S.38-40.

Anonym - Mikrobiologisches Handbuch. E.Merck, Darmstadt.

v.Arx,J.A. (1970) - The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. J.Cramer, Lehre.

v.Arx,J.A. (1987) - A reevaluation of the Eurotiales. Persoonia 13(3):273-300.

Bacon,C.W. (1988) - Procedure for isolating the endophyte from tall fescue and screening isolates for ergot alkaloids. Appl.Environm. Microbiol. 54(11):2615-2618.

Bacon,C.W., J.K.Porter & J.D.Robbins (1981) - Ergot alkaloids biosynthesis by isolates of *Balansia epichloe* and *B.henningsianna*. Can.J. Bot. 59:2534-2538.

Balasubramanian,R. & M.S.Manocha (1986) - Proteinase, chitinase, and chitosanase activities in germinating spores of *Piptocephalus virginiana*. Mycologia 78(2):157-163.

Barklund,P. (1987) - Occurrence and Pathogenicity of *Lophodermium piceae* Appearing as an Endophyte in Needles of *Picea abies*. Trans.Br.mycol.Soc. 89(3):307-313.

Barklund,P. & J.Rowe (1983) - Endophytic fungi in Norway spruce - Possible use in bioindication of vitality. Aquilo Ser. Bot. 19:228-232

Barnett,H.L. (1969) - Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 2.Aufl., Burgess Publishing Company.

de Bary,A. (1884) - Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetocoen und Bacterien. Engelmann, Leipzig.

Bauer,A. (1986) - Das Waldsterben in Abhängigkeit vom Verzweigungstyp der Fichte (*Picea abies* [L.]Karst.). Diplomarbeit, Univ.München.

Bayer. Staatsminist. für Ernährung, Landw. und Forsten (Hrsg.) - Waldschadenserhebung 1985.

Bazzigher,G. (1962) - Ein vereinfachtes Gefriertrocknungsverfahren zur Konservierung von Pilzkulturen. Phytopath.Z. 45:53-56.

Bazzigher,G. & E.Kanzler (1985) - Long-term conservation of living fungal pathogens. Eur.J.For.Path. 15:58-61.

Bernstein,M.E. (1974) - Microbial populations of Douglas fir needles. Ph. D.Thesis, University of Oregon, Eugene.

Bernstein,M.E. & G.C.Carroll (1977) - Internal fungi in old-grown Douglas fir foliage. Can.J.Bot. 55:644-653.

Bertoni,M.D. & D.Cabral (1988) - Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* 2. Distribution of endophytes. Nova Hedwigia 46(3-4):491-501.

Bloomberg,W.J. (1966) - The Occurrence of Endophytic Fungi in Douglas Fir Seedlings and Seed. Can.J.Bot. 44:413-420.

Booth,C. (1959) - Studies of Pyrenomycetes IV. Nectria (part 1). Mycological Papers 73:1-115.

Booth,C. (1971) - Fungal Culture Media. In: C.Booth (ed.): Methods in Microbiology. Vol.4, London & New York, Academic Press.pp.49-93.

Booth,C. (1971) - The Genus Fusarium. Commonwealth Mycol.Inst. Kew, Surrey.

Brandenburger,W. (1985) - Parasitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa. G.Fischer, Stuttgart.

Bresch,C. & R.Hausmann (1972) - Klassische und molekulare Genetik. 3.Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Butin,H. (1973) - Morphologische und taxonomische Untersuchungen an *Naemacyclus niveus* (Pers.exFr.)Fuck.exSacc. und verwandten Arten. Eur.J.For.Path. 3:146-163.

Butin,H. (1983) - Krankheiten der Wald- und Parkbäume. Thieme-Verlag, Stuttgart.

Butin,H. (1986) - Endophytische Pilze in grünen Nadeln der Fichte (*Picea abies* [L.]Karst.). Z.Mycol. 52(2):335-345.

Butin,H & C.Wagner (1985) - Mykologische Untersuchungen zur "Nadelröte" der Fichte. Forstw.Cbl. 104:178-186.

Calvo,M.A., T.Bruguera, F.J.Cabañes, R.M.Calvo, J.Trape & L.Abarca (1985) - Brief communication: Extracellular enzymatic activities of dermatophytes. Mycopathologia 92:19-22.

Carlile,M.J. (1965) - The photobiology of fungi. Ann. review of plant physiology 16:175-201.

Carmichael,J.W., W.B.Kendrick, I.L.Conners L.Sigler (1980) - Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press Edmonton.

Carroll,F.E., E.Müller, & B.C.Sutton (1977) - Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. Sydowia 29(1-6):87-103.

Carroll,G. (1988) - Fungal endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. Ecology 96(1):2-9.

Carroll,G.C. & F.E.Carroll (1978) - Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Can.J.Bot. 56:3034-3043.

Carroll,G.C. & O.Petrini (1983) - Patterns of substrate utilisation by some fungal endophytes from coniferous foliage. Mycologia 75:53-63.

Casal,M., M.J.Linares & M.M.Morales (1985) - Enzymatic profile of *Prototheca* species. Mycopathologia 92:81-82.

Chowdhry,P.N. & A.Varma (1986) - *Cylindrocarpon mangiferum* sp.nov. - A new fungus isolated from mango (*Mangifera indica*) affected with vegetative malformation. Current Science 55(21):1077-1078.

Clay,K., T.N.Hardy & A.M.Hammond,Jr. (1985) - Fungal Endophytes of *Cyperus* and Their Effect on an Insect Herbivore. Amer.J.Bot. 72(8):1284-1289.

Commonwealth Mycological Institute (ed.) (1984) - CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Set 79 Nr.781-790.

Commonwealth Mycological Institute (ed.) (1984) - CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Set 80 Nr.791-800.

Connell,S.L. & D.E.Padgett (1988) - An improved technique for making permanent slide cultures of fungi. Mycopathologia 101:165-166.

Correa,L.C. & W.R.Lodi (1986) - Induction of sporulation in *Blastocladiella emersonii*: Influence of nutritional variables. Experimental Mycology 10:270-280.

Cunningham,J.L. (1972) - A miracle mounting fluid for permanent whole-mounts of microfungi. Mycologia 64:906-911.

Dargan,J.S. (1987) - Tissue types and its role in the taxonomy of Pyrenomycetes. Nowa Hedwigia 44(3-4):489-496.

Das,A., M.Chatterjee & A.Roy (1979) - Enzymes of some higher fungi. Mycologia 71:530-536.

Deighton,F.C. (1984) - *Tretovularia*, a new Hyphomycetous genus. Trans. Br.mycol.Soc. 82(4):743-745.

Dickman,M.B. & S.S.Patil (1986) - A rapid and sensitive assay for the detection of cutinase produced by plant pathogenic fungi. Phytopathology 76:473-475.

DiCosmo,F., H.Peredo & D.W.Minter (1983) - *Cyclaneusma* gen.nov., *Naemacyclus* and *Lasiostictis*, a nomenclatural problem resolved. Eur.J.For.Path. 13:206-212.

Diwani,S.A. & C.S.Millar (1987) - Pathogenicity of three *Lophodermium* species on *Pinus sylvestris* L.. Eur.J.For.Path. 17:53-58.

Domanski,S. & T.Kowalski (1987) - Fungi occurring on forests injured by air pollutants in the upper Silesia and Cracow industrial regions. Eur.J.For.Path.

Donly,B.C. & A.W.Day (1984) - A survey of extracellular enzymes in the smut fungi. Bot.Gaz. 145(4):483-486.

Edgerton,G. (1919) - A New *Balansia* on *Cyperus*. Mycologia 11:259-261.

Ehrenberg,A.S.C. (1986) - Statistik oder der Umgang mit Daten. Verlag Chemie, Weinheim.

Ellis,M.B. (1957) - Some species of *Deightoniella*. Mycological Papers 66:1-12.

Ellis,M.B. & J.P.Ellis (1985) - Microfungi on Land Plants - An Identification Handbook. Croom Helm, London.

Elstner,E.F. & W.Osswald (1984) - Fichtensterben in "Reinluftgebieten": Strukturresistenzverlust. Naturwiss. Rundsch. 37:52-61.

Fairclouth,A., P.Loxley, D.Johnson & J.Mills (1985) - An improved fungal mounting technique for Nomarski microskopy. J.Biol.Educ. 19(3):182-183.

Farris,S.H. (1968) - A rapid method of sectioning dried coniferous needles for mycological studies. Can.J.Bot. 46:1109-1111.

Fischer,E. & E.Gäumann (1929) - Parasitische Pilze. G.Fischer, Jena.

Fisher,P.J., A.E.Anson & O.Petrini (1984) - Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. Botanica Helvetica 94:249-253.

Fisher,P.J. A.E.Anson & O.Petrini (1986) - Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. Trans.Br.mycol.Soc. 86(1):153-193.

Fisher,P.J. & O.Petrini (1987) - Location of endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. Trans.Br.mycol.Soc. 89(2):246-249.

Forster,G.F. (1977) - Effect of leaf surface wax on the deposition of airborne propagules. Trans.Br.mycol.Soc. 68(2):245-250.

Foster (1949) - Chemical Activities of Fungi. Academic Press New York.

Francis,S.M. (1986) - Needle blights of conifers. Trans.Br.mycolSoc. 87(3):397-400.

Francis,S.M., D.W.Minter & T.S.Caine (1980) - Three new species of *Anthostomella*. Trans.Br.mycol.Soc. 75(2):201-206.

Freyer,K. & H.A.van der Aa (1975) - Über *Pyrenochaeta parasitica* spec. nov., die Nebenfruchtform von *Herpotrichia parasitica* (Hartig) E.Rostrup (=*Trichosphaeria parasitica* Hartig). Eur.J.For.Path. 5:177-182.

Friedlander,S.K. & H.F.Johnstone (1957) - Deposition of suspended particles from turbulent gas streams. Ind.Engin.Chem. 49:1151-1156.

Gams,W. & W.Jülich (1986) - Taxonomy and phylogeny of fungi. Progress in Botany 48:294-315.

Gäumann,E. (1951) - Pflanzliche Infektionslehre. 2.Aufl.Birkhäuser,Basel.

Gellen,J. & J.A.Jung (1985) - Zur Mycelcharakterisierung holzzerstörender Pilze auf der Basis von unterschiedlichen Pilzproteinen. Phytopath.Z. 112:1-6.

Glawe,D.A. & J.D.Rogers (1986) - Conidial states of some species of *Diatrypaceae* and *Xylariaceae*. Can.J.Bot. 64:1493-1498.

Gottlieb,L.D. (1977) - Electrophoretic evidence and plant systematics. Ann.Missouri Bot.Gard. 64:161-180.

Gourbiere,F. & M.Morelet (1979) - Le genre *Rhizosphaera* Mangin et Hariot. 1. *R.oudemansii* et *R.macrospora* nov.sp.. Revue de Mycologie 43:81-95.

Gourbiere,F. & M.Morelet (1979) - Le genre *Rhizosphaera* Mangin et Hariot. 2. *R.pini*, *R.kobayashii* et *R.kalkhoffii*. Cryptogamie, Mycologie 1:96-81.

Groß,G. (1987) - Numerische Simulation von Luftströmungen in und über Wäldern. GSF-Berichte 10:51-65.

Grunewaldt-Stöcker,G. (1985) - Zur Verwendung von 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (GMA) als Einbettungsmedium bei histologischen Untersuchungen in der Phytopathologie. Phytopath.Z. 113:150-157.

Grzywacz,A. & J.Wazny (1973) - The impact of industrial air pollutants on the occurrence of several important pathogenic fungi of forest trees in Poland. Eur.J.For.Path. 3:129-141.

Guarro,J. & J.A.von Arx (1987) - The Ascomycete genus *Sordaria*. Persoonia 13(3):301-313.

Hamm,P.B. & E.M.Hansen (1987) - Identification of *Phytophtora* spp. known to attack conifers in the Pacific Northwest. Northwest Science 61(2):103-109.

Hankin,L. & S.L.Anagnostakis (1975) - The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67:597-607.

Hartmann,G., F.Nienhaus, H.Butin (1988) - Farbatlas Waldschäden. Diagnose von Baumkrankheiten. E.Ulmer, Stuttgart.

Hawksworth,D.L., B.C.Sutton & G.C.Ainsworth (1983) - Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 7.Aufl. Commonwealth Mycol. Inst., Kew, Surrey.

Hawksworth,D.L. & A.J.S.Whalley (1985) - A new species of *Rhopalostroma* with a *Nodulisporium* anamorph from Thailand. Trans.Br.mycol.Soc. 84(3):560-562.

Heiniger,U. & M.Schmid (1989) - Association of *Tiarosporella parca* with needle reddening and needle cast in norway spruce. Eur.J.For.Path. 3:in Druck.

Hermanides-Nijhof,E.J. (1977) - *Aureobasidium* and allied genera. In: The black yeasts and allied Hyphomycetes. Studies in Mycology 15:141-177.

Ho,H.H. & S.C.Jong (1987) - Critical problems in the taxonomy of *Phytophtora* species in culture. Mycotaxon 29:207-232.

Hommel,H. (1985) - Elektromagnetischer Smog - Schadfaktor oder Stress? Abstracts, Poster Koll. Waldschäden 18.-20.6.1985, Goslar, VDI

de Hoog,G.S. (1977) - *Rhinocladiella* and allied genera. In: The black yeasts and allied Hyphomycetes. Studies in Mycology 15:1-140.

de Hoog,G.S. (1977) - Survey of black yeasts and allied Hyphomycetes. In: Studies in Mycology 15:178-222.

Horn,N.M. (1985) - Effects of air pollution and acid rain on fungal and bacterial diseases of trees. Rijksinstituut voor onderzoek in de bos- en landschapsbouw "DeDorschkamp" Wageningen, Uitvoerig verslag 20(1).

Hudson,H.J. (1965) - An Ascomycete with *Aureobasidium pullulans* - type conidia. Nova Hedwigia 10:319-328.

Humble,M.W., A.King & I.Phillips (1977) - API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. J.clin.Path. 30:275-277.

Jaaska,V. & V.Jaaska (1986) - Isoenzyme Variation in the Barley Genus *Hordeum* L. 1.Alcohol Dehydrogenase and Superoxide Dismutase. Biochem.Physiol.Pflanzen 181:301-320.

Jarnagin,J.L. & S.K.Harris (1985) - A modified plastic culture flask for microscopic observation of fungi. Mycopathologia 90:55-58.

Jancarik,V., V.Sasek & A.Machulková (1976) - *Lophodermium pinastri* in submerged culture. Eur.J.For.Path. 6:257-264.

Jiménez,M., V.Sanchis, R.Mateo & E.Hernández (1986) - *Penicillium* in pre-harvest corn in Velencia (Spain) 2.Study of the enzymatic and toxigenic capacities of the species. Mycopathologia 96:13-18.

Johnston,P.R. (1988) - An undescribed pattern of ascocarp development in some non-coniferous *Lophodermium* species. Mycotaxon 2:383-394.

Kandler,O. (1981) - Archaebakterien und Phylogenie der Organismen. Naturwiss. 68:183-192.

Knoch (1952) - Klima-Atlas von Bayern. Deutscher Wetterdienst in der US-Zone. Zentralamt Bad Kissingen.

Kolattukudy,P.E. (1984) - How do pathogenic fungi break the plant cuticular barrier? In: Roberts & Aist (eds.): Infection processes of fungi. The Rockefeller Foundation, Conference Report 31-37.

Kolattukudy,P.E. & M.S.Crawford (1987) - The role of polymer degrading enzymes in fungal pathogenesis. In: S.Nishimura et al. (eds.): Molecular determinants of plant diseases. Japan Sci.Soc.Press, Tokyo pp.75-95.

Kowalski,T. (1982) - Fungi infecting Pinus sylvestris needles of various ages. Eur.J.For.Path. 12:182-190.

Kowalski,T. (1983) - Vorkommen von Pilzen in durch Luftverunreinigung geschädigten Wäldern im Oberschlesischen und Krakauer Industriegebiet. 9. Mykoflora von *Quercus robur* L. und *Q.rubra* L. an einem Standort mit mittlerer Immisionsbelastung. Eur.J.For.Path. 13:46-59.

Kowalski,T. (1988) - *Cyclaneusma* (*Naemacyclus*) *minus* an *Pinus sylvestris* in Polen. Eur.J.For.Path. 18:176-183.

Kowalski,T, & K.J.Lang (1983) - Über die Mykoflora in den Nadeln unterschiedlich alter Kiefern (*Pinus sylvestris* L.). Phytopath.Z. 107: 9-21.

Kowalski,T. & K.J.Lang (1984) - Die Pilzflora von Nadeln, Trieben und Ästen unterschiedlich alter Fichten (*Picea abies* [L.]Karst.) mit besonderer Berücksichtigung vom Fichtensterben betroffener Altbäume. Forstw.Cbl. 103:349-360.

Kozlowska,C. (1968) - Badania nad sporulacja osutki sosnowej - *Lophodermium pinastri* (Schrad.)Chev. Prace Inst.Badawczego Lesnictwa 353.

Krivan,V., U.Lüttge & Schaldach (1986) - Profile von Makro- und Mikromineralnährstoffen in gesunden und kranken Fichten (*Picea abies* [L.] Karst.) auf verschiedenen Standorten in Südwestdeutschland. Angew.Bot. 60:373-389.

Krivan,V., Schaldach & Hausbeck (1987) - Interpretation of element analyses of spruce-needles tissue falsified by atmospheric surface deposition. Naturwiss. 74:242-244.

Krug,E. (1988) - Wirkung von Pollutantien und Einflüsse des Waldsterbens auf generative Entwicklungsstadien von *Picea abies* (Karst.)L. und anderen Pinaceae. Dissertation Univ.München.

Kruskal,W.H. & W.A.Wallis (1952) - Use of ranks in one-criterion variance analysis. J.Amer.Statist.Assoc. 47:583-621.

Lang,K.J. & D.Karadzic (1987) - *Dothistroma pini* - Eine Gefahr für *Pinus sylvsetris*? Forstwiss Cbl. 106:45-50.

Latch,G.C.M., L.R.Potter & B.F.Tyler (1987) - Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species. Ann.appl. Biol. 111:59-64.

Leach,C.M. (1967) - Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercosporella*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, and *Stemphylium*. Can.J.Bot. 45:1999-2016.

Leach,C.M. (1971) - A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on Fungi. In: C.Booth (ed.): Methods in Microbiology Vol.4, London & New York, Academic Press. pp.609-664.

Lewis,F.J. (1924) - An endotropic fungus in the coniferae. Nature 114:860.

Luginbühl,M. (1980) - Endophytische Pilze bei *Buxus*, *Hedera*,*Ilex* und *Ruscus*. Diss. ETH Zürich.

Luginbühl,M. & E.Müller (1980a) - Untersuchungen über endophytische Pilze. 1. Infektionswege von Endophyten bei *Hedera helix* L. Ber. Schweizer Bot.Ges. 90(3/4):244-250.

Luginbühl,M. & E.Müller (1980b) - Untersuchungen über endophytische Pilze. 2. Förderung der Samenkeimung bei *Hedera helix* durch *Aureobasidium pullulans* und *Epicoccum purpurascens*. Ber. Schweizer Bot.Ges. 90(3/4):262-267.

Luginbühl,M. & E.Müller (1980c) - Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). Sydowia 33:185-209.

Magan,N. & A.R.McLeod (1988) - In vitro growth and germination of phylloplane fungi in atmospheric sulfur dioxide. Trans.Br.mycol. Soc. 90(4):571-575.

Mann,H.B. & D.R.Whitney (1947) - On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Am.Math. Statist. 18:50-60.

Manocha,M.S. (1987) - Cellular and molecular aspects of fungal host-mycoparasite interaction. J.Pl.Dis.Prot. 94(4):431-444.

Maurer,A. (1987) - Untersuchungen an den Verzweigungstypen der Fichte (*Picea abies* [L.]Karst.) im Zusammenhang mit dem "Waldsterben". Diplomarbeit, Univ.Saarbrücken.

Mayer,H. (1978) - Kenngrößen des vertikalen Windprofils in und über einem Fichtenwald. Agric.Meteor. 19:275-293.

Meinhardt,F. (1986) - Host-Parasite Interactions. Progress in Botany 48:260-265.

Meroney,R.N. (1968) - Characteristics of wind and turbulence in and above model forests. J.Appl.Meteor. 7:780-788.

Micales,J.A., M.R.Bonde & G.L.Peterson (1986) - The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. Mycotaxon 27:405-449.

Micales,J.A. & R.J.Stipes (1987) - A reexamination of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia*. Phytopathology 77:650-654.

Minter,D.W. (1981) - *Lophodermium* on pines. Mycological Papers 147:1-54.

Minter,D.W. & Millar,C.S. (1980) - Ecology and biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *Pinus sylvestris*. Eur.J.For.Path. 10:169-181.

Minter,D.W. & Millar,C.S. (1980) - A study of three pine inhabiting *Lophodermium* species in culture. Nowa Hedwigia 32:361-368.

Minter,D.W., J.M.Staley & C.S.Millar (1978) - Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. Trans.Br.mycol.Soc. 71(2):295-301.

Müller,E. (1986) - On the genus *Diachora* J.Müller (Ascomycetes). Trans.Bot.Soc.Edinburgh, 150th Anniversary Suppl. 69-75.

Muntañola-Cvetkovic,M., D.Bojovic-Cvetic & J.Vukojevic (1985) - An ultrastructural study of α- and β-conidia in the fungal genus *Phomopsis*. Cryptogamie, Mycologie 6:171-184.

Nicholson,R.L. (1984) - Adhesion of fungi to the plant cuticle. In: Roberst & Aist (eds.): Infection processes of fungi. The Rockefeller Foundation, Conference Report 74-89.

Norusis, M.J. (1986) - SPSS/PC+ for the IBM PC/XT/AT. SPSS Inc. Chicago, Illinois.

Ohlenschläger,G., I.Berger & W.Depner (1980) - Synopsis der Elektrophoresetechniken. GIT-Verlag, Darmstadt.

Oliver,E.M., P.D.Bridge & D.L.Hawksworth (1987) - The effect of selected mountants and stains on the measurement of fungal spores. Mycopathologia 97:165-172.

Osorio,M. & K.Rack (1980) - Beobachtungen über Wechselwirkungen dreier Nadelpilze der Kiefer in vitro. Eur.J.For.Path. 10:242-252.

Ouellette,G.B. (1972) - *Nectria macrospora* (Wr.)Ouellette sp.nov. (=*N. fuckeliana* var.*macrospora*): Strains, Physiology, and Pathogenicity and Comparison with *N. fuckeliana* var.*fuckeliana*. Eur.J.For.Path. 2:172-181.

Pagony,H. (1976) - Züchtung von Reinkulturen des Pilzes *Lophodermium pinastri* (Schrad.)Chev. zur Entstehung von sexuellen Fruchtkörpern (Hysterothecien). Eur.J.For.Path. 6:71-74.

Parmeter,Jr.,J.R. (1965) - The taxonomy of sterile fungi. Phytopathology 55:826-833.

Petrini,L. & E.Müller (1986) - Haupt- und Nebenfruchtformen europäischer *Hypoxylon*-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandter Pilze. Mycologia Helvetica 1(7):501-627.

Petrini,L. & O.Petrini (1985) - Xylariaceous Fungi as Endophytes. Sydowia 38:216-234.

Petrini,L. & J.D.Rogers (1986) - A summary of the *Hypoxylon serpens* Complex. Mycotaxon 26:401-436.

Petrini,O. (1984) - Endophytic fungi in British Ericaceae: a preliminary study. Trans.Br.Mycol.Soc. 83:510-512.

Petrini,O. (1985) - Wirtsspezifität endophytischer Pilze bei einheimischen *Ericaceae*. Botanica Helvetica 95(2):213-238.

Petrini,O & G.C.Carroll (1981) - Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. Can.J.Bot. 59:629-636.

Petrini,O. & M.Dreyfuss (1981) - Endophytische Pilze in epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. Sydowia 34:135-148.

Petrini,O. & P.J.Fisher (1986) - Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. Trans.Br.mycol.Soc. 87(4):647-651.

Petrini,O & E.Müller (1979) - Pilzliche Endophyten, am Beispiel von *Juniperus communis* L.. Sydowia 32:224-251.

Petrini,O. & E.Müller (1986) - Die praktische Bedeutung der Endophytenforschung. Swiss Biotech 4(1a):11-14.

Petrini,O., E.Müller & M.Luginbühl (1979) - Pilze als Endophyten von grünen Pflanzen. Naturwissenschaften 66:262.

Petrini,O., J.Stone & F.E.Carroll (1982) - Endophytic fungi in evergreen shrubs in Western Oregon: A preliminary study. Can.J.Bot.60:789-796.

Priehäusser,G. (1958) - Die Fichtenvariationen und Kombinationen des Bayerischen Waldes nach Phänotyp mit Bestimmungsschlüssel. Forstwiss.Cbl. 77:151-171.

Rack,K. & H.Butin (1984) - Experimenteller Nachweis nadelbewohnender Pilze bei Koniferen 1.Fichte (*Picea abies*). Eur.J.For.Path. 14:302-310.

Rack,K. & U.Scheidemann (1987) - Über die Sukzession und pathogene Eigenschaften Kiefernnadeln bewohnender Pilze. Eur.J.For.Path. 17:102-109

Rehfuess,K.E. (1986) - Untersuchungsstandort: Luchsplatzl. Schäden an Fichte. In: KFA Jülich (ed.): Waldschäden - Ursachenforschung in der Bundesrepublik Deutschland und den Vereinigten Staaten von Amerika. pp.72-75.

Rehfuess,K.E. & H.Rodenkirchen (1984) - Über die Nadelröte-Erkrankung der Fichte (*Picea abies* Karst.) in Süddeutschland. Forstw.Cbl. 103:248-262.

Rhodes,J.C. (1986) - A simplified assay for cryptococcal phenoloxidase. Mycologia 78(5):867-868.

Riesen,T. & T.Sieber (1985) - Endophytische Pilze von Winterweizen. Diss. ETH Zürich.

Ridgway,G.J., S.W.Sherburne & R.D.Lewis (1970) - Polymorphisms in the esterases of Atlantic herring. Trans.Am.Fish.Soc. 99:147-151.

Rogers,J.D. (1986) - Provisional keys to Xylaria species in Continental United States. Mycotaxon 27:85-97.

Rogers,J.D. & B.E.Callan (1986) - *Xylaria poitei*: Stromata, cultural description, and structure of conidia and ascospores. Mycotaxon 26:287-296.

Roll-Hansen,F. (1987) - *Phacidium infestans* and *Ph.abietis*. Hosts, especially *Abies* species in Norwegian nurseries. Eur.J.For.Path. 17:311-315.

Rouhiainen,P.O. & J.W.Stachiewicz (1979) - On the deposition of small particles from turbulent streams. J.Heat Transfer 169-177.

Ruck,B. & F.Schmitt (1986) - Das Strömungsfeld der Einzelbaumumströmung. Forstw.Cbl. 105:178-196.

Rubner,K. (1936) - Beitrag zur Kenntnis der Fichtenformen und Fichtenrassen. Thar.Forst.Jb. 87(2):101-188.

Rupácek,V. (1966) - Biologie holzzerstörender Pilze. VEB Fischer Verlag, Jena.

Sachs,L. (1978) - Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin.

Sachs,L. (1988) - Statistische Methoden: Planung und Auswertung. 6.Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Sacks,L.E., A.D.King,Jr. & J.E.Schade (1986) - A note on pH gradient plates for fungal growth studies. J.Appl.Bact. 61:235-238.

Sadik,A., L.Rey & S.Renaudin (1986) - Le système endophytique d'*Arceuthobium oxycedri*. 2. Aspects ultrastructureaux des zones de contact entre les tissus de l'hôte et du parasite. Can.J.Bot. 64:2778-2784.

Saha,D.C., M.A.Jackson & J.M.Johnson-Cicalese (1988) - A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78(2):237-239.

Sampson,K. (1935) - The presence and absence of an endophytic fungus in *Lolium tremulentum* and *L.perenne*. Trans.Br.Mycol.Soc. 19:337-343.

Sampson,K. (1938) - Further observations on the systemic infections of *Lolium*. Trans.Br.Mycol.Soc. 21:84-97.

Sampson,K. (1939) - Additional notes on the systemic infection of *Lolium*. Trans.Br.Mycol.Soc. 23:316-319.

Sathe,A.V. & S.Dighe (1987) - A simple and economic method for long-term preservation of mushroom culture. Current Science 56(10):485.

Satyanarayana,T., L.Chavant & C.Montant (1985) - Applicability of API ZYM for screening enzyme activity of thermophilic moulds. Trans. Br.mycol.Soc. 85(4):727-730.

Schmidt-Vogt,H. (1977) - Die Fichte. Bd.1. Paul Parey, Hamburg & Berlin.

Schmidt,O. (1985) - Occurrence of microorganisms in the wood of Norway spruce trees from polluted sites. Eur.J.For.Path. 15(1):2-10.

Schnell,G.R. (1987) - Investigations of plant diseases in reforestations of the subalpine region in the central Swiss alps. Eur.J.For.Path. 17:19-33.

Schönhar,S. (1985) - Untersuchungen über das Vorkommen pilzlicher Parasiten an Feinwurzeln der Tanne (*Abies alba* Mill.). Allg.Forst- u.J.Ztg. 156(12):247-251.

Schulte-Übbing,C.E.E. (1986) - Stress- und Resistenzmangelsyndrom durch technische Mikrowellen? Herold-Verlag, München.

Schütt,P. (1981) - Folgt dem Tannensterben ein Fichtensterben? Holz-Zentrbl. 11:159f.

Schütt,P. (1985) - Das Waldsterben - eine Pilzkrankheit? Forstw.Cbl. 104 (3-4):169-177.

Schütt,P., H.Blaschke, O.Holdenrieder, W.Koch, K.J.Lang, H.J.Schuck, B.Stümm, H.Summerer (1984) - Der Wald stirbt an Streß. Bertelsmann, München.

Schütt,P., K.J.Lang, M.Dotzler, O.Holdenrieder (1987) - Waldbäume unter der Einwirkung von Witterungsextremen und Immissionen. Der Einfluß von O_3 und SO_2 auf parasitische Pilze und die Prädisposition junger Fichten (*Picea abies* [L.]Karst.). GSF-Berichte 10:77-94.

Selander,R.K., D.A.Caugant, H.Ochman, J.M.Musser, M.N.Gilmour & T.S. Whittam (1986) - Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. Appl.Environm. Microb. 51(5):873-884.

Semerdzieva,M. (1984) - Methods of cultivating some Basidiomycetes in laboratory. Mikologija i Fitopatologija 18(4):339-345.

Sholberg,P.L., A.P.Gaunce & N.P.D.Angerilli (1986) - Fumigation of fungus cultures with ethylene dibromide to control mites. Can.J.Plant Path. 8:342-344.

Sieber,T. (1988) - Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigten Fichten (*Picea excelsa* [Lam.]Link). Eur.J.For.Path. 18(6):321-384.

Sieber,T. & C.Hugentobler (1987) - Endophytische Pilze in Blättern und Ästen gesunder und geschädigter Buchen (*Fagus sylvatica* L.). Eur.J.For.Path. 17:411-425.

Sieber,T, T.K.Riesen, E.Müller, & P.M.Fried (1988) - Endophytic Fungi in four Winter Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) Differing in Resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.)Cast.&Germ. = *Septoria nodorum* (Berk.)Berk.. J.Phytopathology 122:289-306.

Siegel,M.R., G.C.M.Latch & M.C.Johnson (1987) - Fungal endophytes of grasses. Ann.Rev.Phytopathol. 25:293-315.

Siepmann,R. & H.Zycha (1968) - Artdiagnose einiger holzzerstörender Hymenomyceten an Hand von Reinkulturen. Nova Hedwigia 15:559-570.

Snyder,W.C. & T.A.Toussoum (1965) - Current status of Taxonomy in Fusarium Species and their perfect stages. Phytopathology 55:833-837.

Spielman,L.J. (1985) - A monograph of *Valsa* on hardwoods in North America. Can.J.Bot. 63:1355-1378.

Stalpers,J.A. (1978) - Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. Studies in Mycology 16:1-241.

Stephan,B.R. (1973) - Untersuchungen zur Variabilität von *Lophodermium pinastri* 1.Kulturvarianten. Eur.J.For.Path. 3:6-12.

Stephan,B.R. (1973) - Untersuchungen zur Variabilität von *Lophodermium pinastri* 2.Unterschiede im physiologischen Verhalten. Eur.J.For. Path. 3:112-120.

Stimm,B. (1986) - Waldsterben. Eine aktuelle Bestandserhebung, Schadbilder und Schadensumfang. Ecomed Verlag, Landsberg.

Suske,J. & G.Acker (1987) - Internal hyphae in young, symptomless needles of *Picea abies*: electron microscopic and cultural investigation. Can.J.Bot. 65:2098-2103.

Sutton,B.C. (1980) - The Coelomycetes. Commonwealth Mycol. Inst., Kew, Surrey.

Swart,H.J. (1986) - Australian leaf-inhabiting fungi. 24. *Coma circularis* and its Teleomorph. Trans.Br.mycol.Soc. 87(4):603-612.

Tariq,V.N., C.S.Gutteridge & P.Jeffries (1985) - Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. Trans.Br.mycol.Soc. 84(3):381-397.

Tharagonnet,D., P.R.Sisson, C.M.Roxby, H.R.Ingham & J.B.Selkon (1977) - The API ZYM system in the identification of Gram-negative anaerobes. J.clin.Path. 30:505-509.

Thompstone,A. & N.J.Dix (1985) - Cellulase activity in the *Saprolegniaceae*. Trans.Br.mycol.Soc. 85(2):361-366.

v.Tiedemann,S., G.Brendel & H.Fehrmann (1988) - Untersuchungen über endophytische Pilze der Rebe unter besonderer Berücksichtigung des Gefäßsystems der Unterlage. J.Phytopathology 122:147-165.

Todd,D. (1988) - The effects of host genotype, growth rate, and needle age on the distribution of a mutualistic, endophytic fungus in Douglas-fir plantations. Can.J.For.Res. 18:601-605.

Turkensteen,L.J. (1987) - Dark lines between colonies of isolates of *Phoma exigua* var. *foveata* on a semi-selective medium. Neth.J.Pl. Path. 93:87-90.

Vallejos,C.E. (1983) - Enzyme activity staining. In:S.D.Tanksley & T.J. Orton (eds.): Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. pp.469-516. Elsevier New York.

Vasilyeva,L.N. (1986) - Two new species of the family *Diatrypaceae*. Nova Hedwigia 43(3-4):373-376.

Venedikian,N. (1984) - Analisis de la microflora en hoja viva de *Pinus taeda*. Physis (Buenos Aires),Secc.C,42:7-16.

Walter,A., H.D.Payer (1985) - Expositionskammern. Technik und Ausführung. in: Den Wald ins Labor holen. GSF-München-Neuherberg.

Wargo,P.M. (1975) - Lysis of the cell wall of *Armillaria mellea* by enzymes from forest trees. Physiological Plant Pathology 5:99-105.

Watling,R. (1971) - Chemical Tests in Agaricology. In: C.Booth (ed.): Methods in Microbiology Vol.4, New York, Academic Press.

Werner,J. (1986) - Einbettungs- und Färbemethoden für das RWL-Medium RWL Histotechnologie, Bruckmühl, pp.1-20.

White,J.F. (1987) - Widespread distribution of Endophytes in the *Poaceae*. Plant Disease 71:340-342.

White,J.F. & G.T.Cole (1986) - Endophyte-Host associations in forage grasses. IV. The endophyte of *Festuca versuta*. Mycologia 78(1):102-107.

White,J.F., G.T.Cole & G.Morgan-Jones (1987) - Endophyte-host associations in forage grasses. VI. A new species of *Acremonium* isolated from *Festuca arizonica*.

White,J.F. & G.Morgan-Jones (1987) - Endophyte-Host associations in forage grasses. VII. *Acremonium chisosum*, a new species isolated from *Stipa eminens* in Texas. Mycotaxon 28(1):179-189.

Whitney,H.S., J.Reid & K.A.Pirozynski (1975) - Some new fungi associated with needle blight of conifers. Can.J.Bot. 53:3051-3063.

Widler,B. & E.Müller (1984) - Untersuchungen über endophytische Pilze von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.)Sprengel (Ericaceae). Botanica Helvetica 94(2):307-337.

Wilcoxon,F. (1945) - Individual comparison by ranking methods. Biometrics 1:80-83.

Yamazaki,M., S.Goto & K.Komagata (1985) - Taxonomical studies of the genus *Tilletiopsis* on physiological properties and electrophoretic comparison of enzymes. Trans.mycol.Soc.Japan 26:13-22.

Ziegler,H. (1986) - Pflanzenphysiologische Aspekte der Waldschäden. Vorträge/ Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften; N 347. Westdeutscher Verlag, Opladen.

Anhang

Alternaria alternata						1			
Aureobasidium pullulans		2							
Cauthospora sp.			1						1
Cladosporium cladosporioides			1	1					
Coniothyrium fuckelii		3 2 4 5 3	1 1 2			1 1 1			2 1 3 1
Cryptosp.									1
Cyclaneusma minus			1						
Epicoccum purpurascens	1			1					
Hormographium sp.					1 3				
Lachnellula sp.				1					
Lophodermium piceae	1 1 1	3	1 3 5 3 2	5 4 1 7 3 4	1 2	2 1	1 2 3 2 3	1 3 4 2	1
Nodulisporium sp. 1						1 4 4			
Ovularia sp.	1		2				1		
Phomopsis conorum				1		1			1
Pedrosora cf. setosa						1			
Rhinocladiella sp.	1	2 1	2	1 1	1 1				
Rhizosphaera kalkhoffii		1 2 1 1	1	2 1	1	1 1 1			1
Sclerophoma pithyophila		1	1 2 1	1 1 2 1 1	1	1 1			1
Sirococcus avrtillii	1 1	1	1 1 2	1 1	1 3 2 2	4 2			1 2 1
Sirococcus strobilinus					2				
Sordaria fimicola					1				
Tiarosporella parca	1	1	1 15 10 9 10	1 3 6 6 5	1 3 1	1 3 5 5 9	1	5 6 14 13	2 3 7 6 3
Tubercularia sp.		1 2 1							

Isolate von Baum 1 (Arber)

Monat / Pilzarten	Februar 2 3 4 5 6 7 8	April 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Juni 1 2 3 4 5 6 7 8	Juli 1 2 3 4 5 6 7	August 1 2 3 4 5 6 7 8 9	September 1 2 3 4 5 6 7 8	Oktober 1 2 3 4 5 6	November 1 2 3 4 5 6	Dezember 1 2 3 4 5 6 7
Alternaria alternata						1			
Aureobasidium pullulans						2			1
Brunchorstia pinea			2						
Cladosporium cladosporioides			1 1 1	1		1			1
Coniothyrium fuckelii		2 2 1 4 1 1 2	3 1			1 1		1 3	2
Cryptosphaeriopsis abietina				2 1	1 1	1			
Cyclaneusma minus		1							
Cylindrocarpon sp				1					
Epicoccum purpurascens						1			
Fusarium avenaceum			1 1						
Hormographium sp				1 1	1				
Lophodermium piceae	4 1	3	6 5 4 4 6	3 1 1 3 4	1 1	1	1 3 3	2	3
Mollisia sp		1							
Nodulisporium sp. 1					2			1	
Phomopsis conorum				1					
Phomopsis occulta					2 3				
Pragmopycnis sp.								1	
Pyrenochaeta sp				1					
Rhinocladiella sp		1 4	3 3 5	2	1	1 1			
Rhizosphaera kalkhoffii			1 1		1	1			1
Sclerophoma pithyophila		1 2	1 1	2 2		3 1			
Sirococcus avrtillii	3 9 7	3 3 4 3	4 6 1	3 2 1 2 2	1 1 1 1 1	1 3 2	1		2 2
Sirococcus strobilinus		3		3 1 1					
Sirodothis sp								2 2	
Sordaria fimicola						2			
Tiarosporella parca	1 2 11								
Trichoderma viride				1					
Thysanophora penicillioides					1				
Ulocladium botrytis								1	

Isolate von Baum 2 (Arber)

Monat / Probenahmetag	Februar					April							Juni									Juli										August					
	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6
Cladosporium cladosporioides															1	2					1																
Candidium fuckelii									5					4				1			1																
Cryptosporiopsis abietina																	1																				
Dothistroma pini					1																																
Harsonerahlia sp.																														2	1						
Mandarsania sciosia																														1	1						
Lophodermium piceae															1		3									1	5	2									
Rhodulisporium sp.1																																					
Ovularia sp.			1	1											1																						
Phomopsis cerasum																			2																		
Rhinocladiella sp.										1		1			1		1			1	2				1												
Rhizosphaera kalkhoffii	1	1	1	1												1	1	1					2	1				1										
Sclerophoma pithyophila							1										1														1		1				
Sirococcus conigenus				1	2													1	5				2	1		2	2	3	1	1						3	2
Sirococcus sp.	1																																				
Thysanophora penicillioides																																				2	
Tiarosporella parca		1	1	1	1													1	1	1	3						1				3						

Isolate von Baum 3 (Arber)

Monat / Probenahmetag	Mai									Juni									Juli									August								September								Oktober						November					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Alternaria alternata																											3		2																											
Candida friedrichii																			1																																					
Carstocrestis picoae									3																																															
Cyclaneusma pinus													1					1				1																																		
Dothistroma pini																						1																																		
Epicoccus purpurascens			1																																	1																				
Geniculosporium serpens													3																			1			2	2		1			1			1	1							2			
Geniculosporium sp.																			2																																					
Harsonrea sp.										1		3																																												
Libertella sp.																																							2																	
Lophodermium piceae											2	1	2																																											
Myrtellina cydoniae																								1																																
Rhodulisporium sp.1																							1		3											1									1			1							
Rhodulisporium sp.2																						5	1	1	2	1		5	1	1	2	8	4	3	6	11	4					4	1		1										
Pezicula livida																														1																										
Phoma sp.																																		1			2																			
Phomopsis sp.																					2																										1									
Sclerophoma pithyophila															1																																									
Sclerotinia sp.																																													1	1	1									
Thysanophora penicillioides														1																																										
Trichoderma viride																			1																																					
Trichothecium roseum																																				1																				
Tubakia sp.																							1																																	
Tubercularia vulgaris																										1																														
Verticicladium trifidum																																														2									
Xylaria hypoxylon																																	2		1																1		1		

Isolate von Baum 4 (Deisenhofen).

[illegible]	[illegible]									[illegible]									[illegible]									[illegible]									[illegible]									[illegible]					
[illegible]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Alternaria alternata				1			2																		2																						
Aureobasidium pullulans														1														1																		
Candida friedrichii																			5		3													7				1									
Cerebrella picea	2																																														
Cladosporium cladosporioides													1	2														1																		
Drechslera spicifera																				1																										
Epicoccus purpurascens																												1																		
Geniculosporium serbica																									1		1		1				1							1				1		1
Geniculosporium sp.																			9	7	1	8	5					1																		
Geotrichum candidum																																					1			1							
Monascus sp.							1																																								
Ophiella sp																												1																			
Lindeschia sp.															1																																
Lophodermium macrosporum				4	1	1	1					5																																			
Lophodermium picea	1	3		1		1	1						1																														1				
Modulisporium sp.1																														1																	
Modulisporium sp.2												1	1	2															1	2	4	3		4		2	1	1	1	3						3	
Phomopsis cassiae				1																			1																								
Phoseovrovis sp.																																									1						
Pyrenochaeta sp.																																										1					
Rhizoctonielle sp.												1																																			
Scleroshoma sitkensiile												2																																			
Sclerotinia sp															1								1																								
Sirococcus avrtilli																			1	2								1																		
Sirococcus strobilinus							1																																								
Sirodothis sp														1																																	
Thysanophora penicillioides						1									1													1													1						
Trichosporum cf soudeiiare																						1									1																
Tubercularia vulgaris																												2																			
Ulocladium botrytis																																		1					1								
Iriaria [illegible]											1																																		2	1	1	2
Iriaria sp												1	1																																		

Isolate von Baum 5 (Deisenhofen)

Danksagung

An dieser Stelle danke ich all denen, die mit ihrer Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr. Peter Schütt für die Vergabe des Themas, der Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Anleitung der Arbeit.
Dr. Klaus Jürgen Lang und Dr. Harald Schill danke ich für zahlreiche fachliche Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.
Wertvolle Anregungen verdanke ich auch Dr. Gregor Aas, Prof.Dr. Heinz Butin, Dr. Elke Krug, Dipl.Forstw. Josef Maier und Dr. Bernd Stimm.
Dr. Helmut Pruscha bin ich dankbar für Hinweise zur statistischen Auswertung der Daten.
Dipl.Biol. Maria Dotzler danke ich für das gute Arbeitsklima am gemeinsamen Arbeitsplatz.
Bei den Herren Ludwig Schindler und Dipl.Forstw. Steffen Wiebe bedanke ich mich für die nicht ungefährliche Besteigung von Bäumen zwecks Probenahme.
Frau J.Lebherz und Frau Roswitha Vogtmann verdanke ich die Anfertigung fast aller Graphiken.
Den Forstämtern Bodenmais und Sauerlach sowie dem Wetteramt München danke ich für die Überlassung von Bestands- bzw. Klimadaten.
Herrn Dr. Hans-Dieter Payer und seiner Arbeitsgruppe von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung danke ich für die Bereitstellung der Expositionskammern. Prof.Dr. Käs und seinen Mitarbeitern von der Bundeswehr-Hochschule bin ich für ihre großzügige Überlassung von technischem Gerät und der Hilfe bei der Durchführung von Versuchen dankbar.

Lebenslauf

Peter Mack	August-Sieghardt-Str. 2 8217 Grassau/ Chiemgau
25. August 1956	geboren in München
1962 - 1966	Besuch der Volksschule in 8217 Rottau
1966 - 1977	Besuch des Staatl. Landschulheimes in 8215 Marquartstein
1977 - 1979	Wehrdienst in Bad Reichenhall
1979 - 1984	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
seit 1985	Doktorand am Lehrstuhl für Forstbotanik der Ludwig-Maximilians-Universität München